

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ Г-34
КОНТРОЛЬ
ИММУННОГО
ОТВЕТА

СВЯЗЬ
С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ
К БОЛЕЗНЯМ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИММУННОГО ОТВЕТА СВЯЗЬ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К БОЛЕЗНЯМ

Под редакцией Х. МАКДЕВИТТА, М. ЛЭНДИ

Перевод с английского В. И. Литвинова, А. М. Мороза



МОСКВА «МЕДИЦИНА»

1977

Генетический контроль иммунного ответа. Связь с предрасположенностью к болезням. Под ред. Х. МАКДЕВИТТА, М. ЛЭНДИ (пер. с англ.) М., «Медицина», 1977, 384 с., ил.

Genetic Control of Immune Responsiveness. Relationship to Disease Susceptibility. Edited by H. O. McDavitt & M. Landy. Proceedings of an International Conference Held at Brook Lodge Augusta, Michigan, May 8—10 1972. Academic Press New York. London, 1972.

Книга представляет собой материалы международной конференции в г. Агусте, май 1972 г. Она посвящена описанию проблем новейшей области иммунологии — иммуногенетики, разработке теоретических проблем и роли иммуногенетических механизмов в развитии чувствительности к болезням.

Ценность книги заключается в том, что крупнейшими иммуногенетиками мира обсуждаются проблемы, изучение которых по- существу только началось. В книге сделан последовательный переход от описания структурного анализа генов иммунного ответа к их связи с Т- и В-лимфоцитами, рассказано об их взаимосвязи с чувствительностью к болезням. В форме дискуссии обсуждаются все вопросы современной иммуногенетики. Наибольший интерес представляет глава, посвященная роли HLA в развитии болезней у человека, что в настоящее время имеет большое практическое значение. Монография изложена на очень высоком теоретическом уровне и предназначена для иммунологов, генетиков, биологов, онкологов, инфекционистов и врачей других специальностей, интересующихся актуальными проблемами иммуногенетики.

В книге 85 рис., 141 табл.



Г $\frac{51000-288}{039(01)-77}$ —247—77

© Перевод на русский язык. Издательство «Медицина» 1977.

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Когда я получил предложение от издательства «Медицина» написать предисловие к русскому изданию данной книги, я согласился не сразу. Я был знаком с книгой по оригиналу, и мне была известна возможная неоднозначность отношения к ней читателей. И у меня сложилось весьма противоречивое — одновременно одобрительное и неодобрительное — отношение к ней. Тогда я задал себе вопрос: что в ней противоречиво, что может вызывать одновременно и одобрение, и неодобрение.

Прежде чем ответить на этот вопрос, я хотел бы спросить читателя, приятен ли ему стиль, которым начато мое предисловие, следует ли так писать научные книги? Конечно, я далек от мысли, что точно воспроизвел стиль предисловия редакторов английского издания, отдельных разделов книги или обширного комментария доктора Мелвила Кона. Я лишь постарался подготовить читателя к подобному стилю повествования — размышления от первого лица. Точный образец может быть заимствован из текста: «Я подчеркиваю значение конкурирующих теорий. Было бы глупо попытаться быть единственным мудрецом. Я перепрыгиваю с факта на факт, подобно новичку-йогу на горячих углях, и хочу, чтобы читатель также прошел это же испытание огнем. Может быть, это новый путь к нирване. Я сознаю, что этот анализ будет нелегко прочесть».

Подобная форма существенно влияет на содержание. Она делает книгу яркой, но она же и позволяет далеко отходить от фактов, погружаться в недостаточно обоснованные гипотезы или делать окончательные заключения, идя по неоконченным путям.

Конечно, теперь, по прошествии нескольких лет со дня выхода книги, легко указывать на то, что не подтвердилось, и восхищаться предвидением. В 1972 г. многие факты осмысливались впервые. Само осмысливание и гипотезирование (даже ошибочное!) было необходимо как воздух для столь бурно развивающейся отрасли знаний, каковой является иммунология.

Книга разделена на 7 частей. Первые шесть — это стенографические материалы научных сессий, состоявшихся в течение Международной конференции в Брук Лодже в мае 1972 г. Седьмая часть (а по объему она занимает не менее 25% от всей книги) — это комментарии и оценка результатов конференции, данные М. Коном. В итоге получаются как бы два взаимно дополняющих друг друга раздела. Один — это научные факты с их первичным обсуждением, другой — глубокий научный анализ накопленных фактов.

Доктор М. Кон в своих комментариях стремится быть в высшей степени объективным. Один из наиболее ярких примеров тому — анализ иммуноглобулиновой природы рецепторов Т-лимфоцитов. Разбираются доводы в пользу этого положения, доводы против него и другие взгляды на рецепторы Т-клеток. Автор приходит к выводу о том, что диапазон и уровень специфичности рецепторов Т-клеток такие же, как и у В-клеток, но различен словарь. Они «прочитывают» разные части антигенных молекул. Этот

вывод оказался удивительно точным, хотя вопрос о природе рецепторов на Т-лимфоцитах окончательно не решен.

Еще одно предсказание, сделанное в комментариях, удивляет своей точностью. Речь идет о предупреждении иммунологов об условности понятия «тимуснезависимый антиген» или «тимуснезависимый иммунный ответ». Т-клетка оказалась необходимой для индукции всех классов В-клеток. За прошедшие годы открыты особые Т-лимфоциты. Они получили название Т-супрессоров. Без них «тимуснезависимый» ответ усиливается; иначе говоря, действительно любой иммунный ответ тимусзависим.

Не всегда, конечно, доктор М. Кон предвидит так точно. Само открытие Т-супрессоров непредвиденно. А отсюда отсутствие современной интерпретации иммунологической толерантности как активного процесса, диктуемого Т-супрессорами. Автор рассматривает толерантность и иммунологический паралич как следствие элиминации или инактивации антигеночувствительных Т- и В-клеток, наступающей после взаимодействия их рецепторов с антигеном.

Иногда автор догматизирует постулат, который еще подлежит проверке. Так, например, утверждается отсутствие влияний, исходящих со стороны В-клеток, на ответ Т- или В-лимфоцитов. Иногда для доказательства используется непригодный прием. Например: «Если Бог действует через модель соматической мутации, то можно предсказать, что специфические доминантные Ig-гены являются V-генами».

Однако все это лишь демонстрирует многогранность материалов книги, их дискуссионность и насыщенность фактами, мыслями, гипотезами.

Изучение генетического контроля иммунного ответа — это та отрасль иммуногенетики, в которой зарождаются совершенно новые теоретические и практические принципы. Один из них — принцип конкретности иммунного ответа. Стало аксиомой, что одна и та же антигенная молекула вызывает иммунный ответ разной силы: от нуля до очень высокого у организмов одного вида, но разных генотипов, и, наоборот, один и тот же индивидуум в разной степени реактивен по отношению к разным антигенам.

Понятие «общая иммунологическая реактивность», характеризующее способность иммунной системы функционировать, перестало удовлетворять иммунологов. Стало очевидным, что иммунологическая реактивность организма всегда конкретна: по отношению к одному антигену одна, к другому — другая, к третьему — третья. А это значит, что невозможность создания эффективной вакцины против того или иного инфекционного агента не обязательно связана с неумением получить хорошую аттенуированную форму его или выделить и очистить активную антигенную субстанцию. Если большой процент людей несет ген низкого иммунного ответа к данной антигенной субстанции, то создать эффективный иммунитет против нее невозможно, как бы чисто мы ее не выделили. Необходимо найти принципиально новые пути воздействия на иммунную систему, а также способы фенотипической коррекции, т. е. превращения генетически низкореагирующих особей в высокореагирующие. Именно на этом пути могут быть созданы наиболее эффективные вакцины.

Принцип конкретности иммунного ответа ставит на повестку дня принцип индивидуализации вакцин, в соответствии с которым против одной и той же инфекции одни группы лиц должны вакцинироваться одними вакцинами (или по одним схемам), другие — другими (или по другим схемам). Для этого, конечно, необходима разработка простых тестов с целью определения генетически обусловленной силы иммунного ответа индивидуума на тот или иной конкретный антиген до иммунизации. Я не сомневаюсь,

что в недалеком будущем будут созданы препараты, обеспечивающие фенотипическую коррекцию, а вакцинации будут проводиться после предварительной характеристики лица, вакцинируемого по генам иммунного ответа, подобно тому как определяют эритроцитарные группы перед переливанием крови.

Большая часть книги посвящена фактически этой проблеме — сцепленности генов иммунного ответа с иммуноглобулиновыми аллотипами, с антигеноспецифическими рецепторами Т- и В-клеток, с генами главной системы гистосовместимости HLA. Приведенные данные устанавливают несомненность существования связей между HLA-антигенами и определенными заболеваниями. Значение обнаружения предрасположенности к тем или иным заболеваниям у лиц, несущих тот или иной антиген гистосовместимости, нельзя переоценить. Например, по данным разных авторов, от 88 до 96% лиц, страдающих анкилозирующим спондилитом, несут ген HLAW27 при частоте встречаемости его среди здоровых людей, равной всего 4%. Сходная ситуация наблюдается при энтеропатии новорожденных (повышенная частота HLA8). При рассеянном склерозе повышена частота гена HLA3.

Иммунологи и генетики ищут фенотипические проявления, характеризующие генотип по генам иммунного ответа, ищут механизмы реализации действия этих генов и пути фенотипической коррекции.

Настоящая книга — этап совместной работы иммунологов и генетиков. Не поздно ли мы ее переводим? Не устарел ли фактический материал, и не стали ли тривиальны дискуссии? Нет. Книга сохраняет свою актуальность. Это объясняется тем, что проблемы генетического контроля иммунного ответа отличаются большой сложностью. В единый узел сплетены по крайней мере три уровня генного контроля: 1) контроль развития органов и подсистем иммунной системы с возможностью возникновения первичных иммунодефицитов; 2) контроль синтеза иммуноглобулинов, выражающийся продукцией уникальных в своих переменных участках молекул; 3) контроль распознавания чужеродных молекул и силы иммунного ответа на каждую из них.

Ежегодно в мире накапливается все более сложный для освоения материал. Без иммуногенетической подготовки осмыслить его чрезвычайно трудно. Предлагаемая книга обобщает накопленный материал и выводит читателя на уровень знаний 1972 г. Не освоив этот уровень, невозможно идти дальше. Но и этот уровень не прост. Книгу нельзя читать между прочим. Ее нужно прорабатывать тщательно и терпеливо. Нет никакого сомнения в том, что она принесет большую пользу внимательному читателю, будь он иммунологом или генетиком, биологом или врачом, студентом или научным работником.

Член-корреспондент АМН СССР проф. Р. В. ПЕТРОВ

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРОВ РУССКОГО ИЗДАНИЯ

Генетический контроль иммунного ответа — один из центральных вопросов современной иммуногенетики, науки, которая развивается в настоящее время стремительными темпами и привлекает внимание все большего числа исследователей — биологов и медиков. За последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в изучении генетического контроля иммунного ответа у разных видов животных и у человека. Получено немало данных о природе, локализации и механизмах действия генов иммунного ответа (Immune response genes — гены Iг).

Предлагаемая читателю книга — это материалы чрезвычайно представительной Международной конференции, состоявшейся в Brook Lodge (США) в 1972 г., на котором были подведены итоги первого этапа исследований по упомянутым выше проблемам. Несмотря на то что с тех пор прошло несколько лет и получены дополнительные данные, проливающие свет на поставленные на симпозиуме вопросы, книга эта по-прежнему актуальна. На конференции на самом высоком уровне обсуждалось то, что находится в центре внимания иммуногенетиков, а именно природа рецептора Т-клеток и продуктов генов Iг, соотношения генов иммунного ответа, сцепленных и не сцепленных с главной системой тканевой совместимости. Наконец, первостепенное значение имеет проблема связи некоторых заболеваний с системой HLA человека, которая в конечном счете может трансформироваться в проблему генетического контроля предрасположенности к тому или иному заболеванию.

Нет смысла перечислять, каким проблемам конкретно посвящен тот или иной раздел книги, — это видно из подзаголовков каждой главы. Однако надо сказать, что особый интерес представляет заключительный раздел. В отличие от всех остальных, которые являются стенограммой конференции, заключительный раздел написан автором — Мелвином Коном и представляет собой попытку обобщения экспериментальных данных и их интерпретации с точки зрения гипотезы об ассоциативном распознавании антигена. Этот анализ, хотя и субъективный, выполненный крупным исследователем-иммунологом, содержит все данные, представленные на конференции, и очень интересен как по форме, так и по содержанию.

При чтении этой книги следует учитывать, что иммуногенетика переживает период бурного развития и ее концепции подвергаются непрерывному пересмотру. Не избежали этой участи и некоторые выводы, сделанные участниками конференции в Brook Lodge. Поэтому мы считаем целесообразным хотя бы перечислить основные обобщения, касающиеся генетического контроля иммунного ответа, которые были сделаны уже после 1972 г.

Генетическая область между генами H-2K и Ss—Slp в комплексе H-2 мыши (область I) в настоящий момент разбита на несколько участков (IA, IB, IC, IE), разделяемых кроссинговером, с каждым из которых сцеплена способность к иммунному ответу при иммунизации некоторыми искусственными или естественными полимерами. В последние 2—3 года в области I обнаружены гены, продукты которых выявляются при помощи соответст-

вующих антисывороток в цитотоксическом тесте, т. е. являются серологически определенными антигенами. Они получили название антигенов Ia, и было установлено, что они присутствуют на поверхности В-клеток. Кроме того, в 1976 г. обнаружено, что в субобластях IA и IC картируются гены тканевой совместимости H-2IA и H-2IC. Несмотря на наличие биохимических различий между антигенами H-2 и Ia (последние не содержат β_2 -микроглобулина), бросается в глаза большое функциональное сходство между генами области I и «классическими» генами H-2K и H-2D, что, впрочем, несколько не проясняет проблему биохимических взаимоотношений их продуктов. С этой точки зрения важно выяснить, как осуществляется генетический контроль иммунного ответа против трансплантационных антигенов. В самое последнее время получены первые данные, указывающие на то, что этот иммунный ответ может быть сцеплен с комплексом H-2 и что сами по себе антигены H-2 могут играть роль в распознавании чужеродных антигенов Т-клетками, т. е. «распознавать самих себя».

Наряду с генами, контролирующими бласттрансформацию в смешанной культуре лимфоцитов, действие которых рассмотрено на симпозиуме достаточно подробно, в области I картированы гены, определяющие успех взаимодействия Т- и В-клеток (а также различных популяций Т-клеток) в иммунном ответе, — гены CI (от английского cell interaction). Дальнейший прогресс достигнут и в изучении связи между восприимчивостью к различным болезням и системой HLA.

Вместе с тем еще многие вопросы о генах Ig остаются невыясненными, и в первую очередь вопрос о том, соответствует ли каждому типу антигенных детерминант свой особый ген Ig или один ген может регулировать иммунный ответ против многих антигенных детерминант. Если каждому антигену соответствует свой отдельный ген иммунного ответа, то отпадает необходимость в соматической генерации иммунологического распознавания, постулированной Бернетом. Открытым остается вопрос и о природе рецепторов Т-клеток. Исследования генетических закономерностей иммунного ответа быстро развиваются, и в этой области в ближайшем будущем можно ожидать много новых открытий.

В заключение следует отметить, что в книге сохранена терминология 1972 г. В настоящий момент она изменилась. Не имея возможности подробно касаться современной терминологии, мы отсылаем читателей к специальной литературе, в которой, кстати, он найдет и обзор новых иммуногенетических данных¹.

Настоящая монография представляет большой интерес для иммунологов, генетиков, врачей и биологов различных специальностей, интересующихся вопросами иммуногенетики.

Доктор биологических наук И. К. ЕГОРОВ,
проф. М. М. АВЕРБАХ

¹ Histocompatibility Testing, Munksgaard, Kopenhagen, 1975. Snell G., Dausset T., Nathanson S. Histocompatibility. Acad. Press, N 4, 1976.

ВСТУПЛЕНИЕ

Теперь, когда закончен запланированный цикл 5 иммунологических конференций в Brook Lodge, было бы уместно поразмыслить о первоначальных причинах, которые в 1966 г. привели к организации этих иммунологических коллоквиумов. Они порождены мыслью, что иммунология как динамическая, продуктивная и интереснейшая биологическая наука выиграла бы от организации ряда специализированных симпозиумов, где оценивались и обобщались бы данные и информация, накапливающиеся растущими темпами, с тем, чтобы можно было бы наметить пути дальнейших исследований. К тому же роль организатора этих конференций вполне соответствовала задачам Национального института здравоохранения (США — ред.), который в прошлом поддерживал большинство исследований в этой области.

Теперь, когда прошло 6 лет и состоялось 5 симпозиумов в Brook Lodge, стало ясно, что проблема коммуникаций оказалась весьма сложной и трудной. В иммунологии новые открытия и новые направления исследований возникают такими темпами и в таком объеме, которые намного превышают нашу способность усвоить и оценить всю эту информацию так, чтобы можно было содействовать рациональному прогрессу. Несмотря на то что эта ситуация известна всем, так же как и угроза ее для развития иммунологических знаний, в литературе по-прежнему публикуется огромное количество данных и открытий. Редко организуются совещания или конференции с тем, чтобы рассортировать, проанализировать эту гору информации и выяснить, какие элементы ее действительно важны и имеют прямое отношение к интересующему нас вопросу.

Ценность этих 5 конференций и опубликованных ими трудов должна быть установлена научными кругами, которым они должны были помочь. Однако уже сейчас ясно, что план этих конференций дал возможность выступить замечательным представителям нашей науки и конструктивно использовать их дарования. Как свидетельствует этот, 5-й, том, характер и масштабы концепций, которые можно сформулировать в 1972 г., теперь изменены и приобрели значительно большую конкретность и точность, чем наши представления, существовавшие всего 5 лет назад.

МОРИС ЛЭНДИ — директор программ по аллергии и иммунологии Национального института аллергии и инфекционных заболеваний

ПРЕДИСЛОВИЕ

Несколько лет назад предложение изучать наследование специфических иммунных ответов у нормальных животных было бы встречено скептически, если не с насмешкой. К счастью, ряд случайных наблюдений привел к тому, что исследователи сознательно попытались изучать генетический контроль специфических иммунных ответов, и теперь установлено, что существует множество специфических генов иммунного ответа. Информация в этой области быстро накапливается, и теперь мы уже знаем, что есть несколько различных типов генов иммунного ответа. Эти Ig-гены, по-видимому, можно разделить на два основных класса.

Первыми к определенной группе сцепления были отнесены гены специфического иммунного ответа, сцепленные с тканевой совместимостью; они, видимо, кодируют антигенные рецепторы Т-клеток.

Тесная связь между генами Ig, сцепленными с тканевой совместимостью, и генами, кодирующими главные антигены гистосовместимости, указывает на важную структурную и функциональную взаимозависимость между антигенами тканевой совместимости и специфическими антигенными рецепторами на иммунокомпетентных Т-клетках.

Второй основной класс Ig-генов, который можно отнести к определенной группе сцепления, — это гены иммунного ответа, сцепленные аллотипом иммуноглобулина, которые, видимо, проявляются в иммунокомпетентных лимфоцитах костномозгового происхождения и детерминируют структуру антигенного рецептора В-клеток.

Таким образом, мы наблюдаем поразительную симметрию: две разные линии клеток, каждая из которых обладает антигеноспецифической клональностью, имеет свой набор антигенных специфичностей и свой механизм антигенного распознавания. Антигенное распознавание Т-клетками, видимо, находится под контролем сцепленных с гистосовместимостью генов иммунного ответа, которые, возможно, кодируют структуру антигенного рецептора Т-клеток. С другой стороны, В-клетки распознают антиген посредством проявления на их поверхности иммуноглобулиновых рецепторов, которые кодируются генами, сцепленными с аллотипом иммуноглобулинов.

Большинство иммунологов согласны с тем, что иммуноглобулины функционируют как антигенные рецепторы на В-клетках, и это положение поддерживается внушительным объемом экспериментальных данных. Однако с точки зрения современной «иммунологической догмы» гипотеза о том, что антигенный рецептор Т-клеток не принадлежит ни к одному из известных классов иммуноглобулинов, представляется еретичной.

Основная часть настоящего тома состоит из подтверждений и опровержений гипотезы о том, что Ig-гены, сцепленные с тканевой совместимостью, контролируют структуру антигенного рецептора Т-клеток, и из соображений о характере этого рецептора. Вопрос этот пока не решен, и только читатель может определить, насколько убедительно изложены эти положения.

Мимоходом надо заметить, что существование двойной системы взаимодействующих типов клеток, каждый из которых имеет свой особый механизм распознавания антигенов, допускает значительно более точную регуляцию синтеза антител на многих уровнях, что, возможно, является важной мерой, препятствующей слишком частому развитию аутоиммунитета. Возможно, что гены специфического иммунного ответа, сцепленные с гистосовместимостью и с аллотипом иммуноглобулинов, обладают большой селективной ценностью и их существование является итогом длительной селекции в течение эволюционного процесса. Эта мысль уже подтверждена многочисленными примерами связи между типом гистосовместимости и специфическими заболеваниями как у животных, так и у человека. Каузальные механизмы, лежащие в основе этих связей, пока еще не ясны, и, прежде чем удастся их изучить, несомненно, потребуются создать новые методы для определения генотипов иммунного ответа у животных и у человека и для выявления клеточного иммунитета против таких патогенных агентов, как лейкемогенные вирусы. В настоящее время эта область науки только зарождается, однако есть все основания полагать, что такие методы могут быть созданы и что корреляция между генами иммунного ответа и различными заболеваниями будет определена, и это в конечном счете окажется весьма важным для изучения патогенеза для прогнозирования предрасположенности к болезням.

Несмотря на то что эта область науки быстро развивается, особенно в течение последних нескольких лет, в литературе все чаще появляются сообщения о новых генах иммунного ответа и новых связях между типом гистосовместимости и специфическими заболеваниями. Это указывает на то, что сделать предстоит больше, чем было сделано.

В этой книге мы попытались объединить экспериментальные данные о механизме действия специфических генов иммунного ответа и одновременно показать, как факт существования двух основных классов генов иммунного ответа отражается на нашем понимании теоретической иммунологии и антителогенеза, с одной стороны, и факторов, определяющих предрасположенность организма к болезни, — с другой. Мы надеемся, что доклады, представленные в этом томе, и свободное обсуждение их помогут прояснить смысл уже сделанных наблюдений и наметить пути дальнейшей работы.

ХЬЮ О. МАКДЕВИТТ; МОРИС ЛЭНДИ

Сессия 1

МЕСТО ДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТКЕ I γ -ГЕНОВ, СЦЕПЛЕННЫХ С ГИСТОСОВМЕСТИМОСТЬЮ

Контроль I γ -генами функций «чисто» Т-клеток. Аналогичный контроль распознавания носителя. Блокирование функций I γ -генов аллоантисыворотками против антигенов тканевой совместимости. Регуляция I γ -генами переключения от Ig M к IgG. Проявление I γ -генов в Т- и В-клетках. Специфичность антител, образуемых у отвечающих и не отвечающих особей. Образование антител типа «неотвечающих особей» у тетрапарентальных мышей.

Словарь терминов и определений к материалам сессии 1

Ввиду сложности ряда антигенов, которые упоминаются на этой сессии, а также ввиду того, что в дискуссиях используются некоторые «сокращенные» термины, редакторы считают желательным привести здесь словарь, описывающий эти антигены и термины и поясняющий их читателю. В течение всех дискуссий широко применяются некоторые сокращенные обозначения и термины, которые следует пояснить:

1. Т-клетка — антигенреактивный иммунокомпетентный лимфоцит тимусного происхождения.

2. В-клетка — иммунокомпетентный лимфоцит костномозгового происхождения, несущий иммуноглобулины на поверхности и служащий предшественником антителопродуцирующих лимфоцитов и плазмоцитов.

3. V-ген — структурный ген, кодирующий переменную область определенного иммуноглобулина или иммуноглобулина определенного класса.

4. С-ген — структурный ген, кодирующий константную область тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов.

В материалах этой сессии несколько раз упоминаются следующие антигены, которые ниже обозначаются сокращенно. Вместо того чтобы пояснять каждое сокращение в тексте, мы решили дать общие пояснения в словаре.

ПЛЛ — линейный полимер, состоящий целиком из поли-L-лизина.

ДНФ-ПЛЛ — поли-L-лизин, замещенный динитрофениловыми группами на ϵ -аминогруппах лизина.

ГА — линейный полимер глютаминовой кислоты и аланина.

ГЛ — линейный полимер глютаминовой кислоты и лизина.

ДНФ-ГЛ — линейный кополимер глютаминовой кислоты и лизина, замещенный динитрофенильными группами на ϵ -аминогруппах лизина.

ГТ — линейный кополимер глютаминовой кислоты и тирозина.

ГАТ₁₀ — линейный кополимер глютаминовой кислоты, аланина и тирозина, в котором 10% аминокислотных остатков принадлежит тирозину.

БСА — бычий сывороточный альбумин.

ДНФ-БСА — бычий сывороточный альбумин, замещенный динитрофенильными группами, причем количество динитрофенильных групп на молекулах БСА указано цифрой, проставленной после ДНФ.

МАС — альбумин морской свинки.

ДНФ-МСА — альбумин морской свинки, замещенный динитрофенильными группами.

ЧСА — человеческий сывороточный альбумин.

(Т, Г)-А-Л — разветвленный многоцепочечный кополимер с общей структурой, показанной на рис. 20 (сессия 2). Кополимер имеет структурную формулу: поли-L-(тирозин, глутаминовая кислота)-поли-D, L-аланин-, поли-L-лизин. Структурная формула пишется таким образом, чтобы показать, что аминокислоты в скобках имеют произвольную последовательность, дефис означает большой участок поли-D, L-аланина, а двойной — точку разветвления, где аланин соединяется с ε-аминогруппами лизина, образующего остов молекулы. Таким образом, синтетический полипептид построен на цепи поли-L-лизина, причем в ε-аминогруппе каждого лизина имеется замещение длинной боковой цепью аланина и к аминоконцу этой цепи прикреплена короткая случайная последовательность из тирозина и глутаминовой кислоты.

(Г, Г)-А-Л-поли-L — (гистидин, глутаминовая кислота)-поли-D, L-аланин-поли-L-лизин. Структурный аналог (Т, Г)-А-Л, в котором тирозин замещен гистидином.

(Ф, Г)-А-Л-поли-L — (фенилаланин, глутаминовая кислота)-поли-D, L-аланин-поли-L-лизин. Структурный аналог (Т, Г)-А-Л, где тирозин заменен фенилаланином.

(Т, Г)-Про-Л-поли-L — (тирозин, глутаминовая кислота)-поли-L-пролин-поли-L-лизин. Этот синтетический полипептид имеет ту же общую структуру, что и (Т, Г)-А-Л и его аналоги, но в этом случае боковые цепи поли-D, L-аланина замещены поли-L-пролином.

(Ф, Г)-Про-Л-поли-L (фенилаланин, глутаминовая кислота)-поли-L-пролин-поли-L-лизин. Структурный аналог (Т, Г)-Про-Л, где тирозин замещен фенилаланином.

Председатель Simonsen. Тему этой конференции можно было бы назвать: иммунология Т-клеток на распутье. Возможно, все мы сознаем, что вступили в очень волнующий, решающий этап развития иммунологии, когда мы должны рассмотреть ту половину иммунного аппарата, которая называется Т-клетками, и выяснить, каким образом эти клетки распознают чужеродные антигены, или, иными словами, что же представляет собой неуловимый Т-клеточный рецептор?

С самого начала мы должны признать, что никто из нас пока не знает ответа. Следовательно, на современном этапе от нас требуется почти мучительная готовность принять самые разнообразные возможности. На этом общем фоне я прошу Вепасеггаф рассказать нам, каким образом изучение генетического контроля иммунных ответов у морских свинок и мышей смогло привести иммунологию Т-клеток к ее современному уровню.

Вепасеггаф. Иммунологические конференции в Brook Lodge убедительно доказали, как важно смело и ясно формулировать проблему, так, чтобы высказанная мысль могла быть принята или опровергнута на основании существующих данных. Такой подход особенно важен для того, чтобы справиться со сложной темой, стоящей перед нами сейчас.

Прежде всего я хочу определить различные классы генов специфического иммунного ответа, которые уже открыты, и рассказать о том, как они были открыты. Я остановлюсь также на свойствах этих Ig-генов и клеток иммун-

ной системы, в которых они проявляются. Затем я приведу данные, полученные в нашей лаборатории и других лабораториях и взятые в основу наших выводов.

ТАБЛИЦА 1

Антигены, использованные при идентификации Ig-генов, сцепленных с гистосовместимостью

-
- I. Синтетические полипептиды с ограниченным количеством L-аминокислот
 - II. Лимитирующие иммунизирующие дозы сложных белковых антигенов
 - III. Слабые пативные изологичные антигены
-

В свое время открытие специфических генов иммунного ответа (Ig-генов) потребовало иммунизации беспородных животных и инбредных линий антигенами ограниченной структурной гетерогенности, которые предъявляют иммунной системе «ограниченный вызов» (табл. 1), например:

- 1) синтетические полипептиды;
- 2) изоантигены, которые мало отличаются от аутологичных компонентов;
- 3) ограниченные иммунизирующие дозы нативных антигенов, как первоначально установили Var, Levine и Green, а также мы.

При такой иммунизации можно наблюдать четкие индивидуальные различия ответа.

В противоположность нашим ожиданиям, основанным на известной значительной гетерогенности специфичностей иммуноглобулинов, мы, к своему удивлению, установили, что иммунный ответ на многие антигены перечисленных типов находится под контролем отдельных доминантных аутосомных генов. Этот моногенный контроль был особенно очевиден для тех типов иммунных ответов, которые можно связать с клетками тимусного происхождения, а именно повышенная чувствительность замедленного типа, распознавание носителя при синтезе антител в случае иммунизации комплексом гаптен-носитель, а также реакции клеточного иммунитета *in vitro*, как, например, образование фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (МИФ), и специфическая бласттрансформация.

В некоторых системах, изученных McDevitt, Selo и Grumet у мышей, различия в синтезе антител, контролируемых специфическими Ig-генами, имеют количественный характер и отражают прежде всего отсутствие антител класса IgG и вторичного ответа у животных, не имеющих специфических Ig-генов, что характерно для реакции на тимуснезависимые антигены.

Эти различные наблюдения, таким образом, позволяют предполагать, что первый класс открытых специфических Ig-генов обязательно проявляется в клетках тимусного происхождения. К тому же мы должны подчеркнуть, что Ig-гены специфичны и своеобразны, так как они контролируют специфическое распознавание разных антигенов.

Важное открытие было сделано McDevitt и Tuan, которые установили, что именно этот класс генов, примером которых можно назвать локус Ig-1, тесно сцеплен с главной системой тканевой совместимости у мышей. Это наблюдение было подтверждено для различных генов иммунного ответа у мышей и генов специфического иммунного ответа, имеющих такие же свойства у морских свинок, а позднее у крыс.

Мы считаем, что сцепление с главной системой тканевой совместимости не случайно и имеет какой-то определенный смысл и что благодаря этому свойству данный тип Ig генов можно выделить в особый класс. Мы считаем

также, что это сцепление связано с типом клеток, где проявляются гены, и с выполняемой ими функцией.

Одно из важнейших свойств Ig-генов, сцепленных с гистосовместимостью (H-сцепленных генов), которое было установлено уже давно, состоит в том, что при моногенном наследовании иммунный ответ весьма гетерогенен в отношении класса, специфичности и аффинитета образуемых антител. Было установлено также, что, поскольку H-сцепленные Ig-гены локализируются в комплексе H-2, они не могут быть сцеплены с известными структурными генами тяжелых или легких цепей иммуноглобулинов и с аллотипами иммуноглобулинов, поскольку система HL-A человека и система H-2 мыши находятся в других группах сцепления. Мы считаем, что у этих видов аллотипы иммуноглобулинов являются маркерами С-области. Однако, судя по данным об аллотипах кроличьих иммуноглобулинов, есть все основания ожидать, что V- и С-гены расположены на одной и той же хромосоме.

Следовательно, мы вправе сделать вывод, что H-сцепленные Ig-гены отличаются от известных V-генов иммуноглобулинов. Тем не менее нельзя исключить возможность, что существует новый набор редуцированных V-генов, сцепленных с H-комплексом.

Затем я хотел бы подчеркнуть, что открытие H-сцепленных Ig-генов оказалось несложным, при условии, что использовались антигены ограниченной гетерогенности или ограниченные дозы нативных антигенов. Различия, зависящие от наличия или отсутствия гена, являются абсолютными и качественными, особенно в отношении клеточного иммунитета. Те же антигены не дали возможности идентифицировать Ig-гены, сцепленные с аллотипами. Вместе с тем вскоре стало ясно, что существуют специфические Ig-гены, сцепленные с аллотипом, которые, очевидно, контролируют V-области иммуноглобулинов. Однако антигены, необходимые для идентификации этих генов, и методика исследований должны быть иными, чем при обнаружении H-сцепленных Ig-генов. Для идентификации Ig-генов сцепленных с аллотипом надо пользоваться антигенами, которые индуцируют синтез антител с клональными свойствами и особой гомогенностью, такими, как стрептококк и пневмококковые полисахариды. Более того, генетически контролируемые различия в иммунном ответе на эти антигены не относятся к типу «все или ничего», а скорее касаются качества или специфичности вырабатываемых антител. Таким образом, для выявления этих различий требуется довольно сложный анализ, дающий возможность различать оттенки специфичности или популяции антител с определенной идиотипической специфичностью. Следовательно, от сцепленных с аллотипом специфических Ig-генов зависит, удастся ли обнаружить среди популяции вырабатываемых антител антитела с особой специфичностью или идиотипом. Следовательно, эти гены должны прямо контролировать структуру вариабельной области иммуноглобулинов.

Итак, существуют два разных класса специфических Ig-генов: H-сцепленные Ig-гены, обязательно проявляющиеся в Т-клетках, и сцепленные с аллотипом Ig-гены, связанные со структурой иммуноглобулинов и обязательно проявляющиеся в В-клетках. H-сцепленные Ig-гены, видимо, связаны с распознаванием значительно более ограниченного класса антигенов или диапазона специфичностей, чем иммуноглобулиновые структурные гены V-области, поэтому столь различна методика, требуемая для распознавания двух типов Ig-генов.

Таким образом, открытие H-сцепленных Ig-генов и соображения относительно специфического процесса, который они контролируют в Т-клетках, вызывают некоторое сомнение в правомерности принятой установки, со-

гласно которой имеется только один тип молекул, ответственный за иммунологическую специфичность, а именно иммуноглобулины (посредством V-области их тяжелых и легких цепей).

Эта установка привела некоторых иммунологов к выводу, что, поскольку существуют два класса лимфоцитов (Т и В), связанных с двумя типами иммунного ответа (клеточного и гуморального соответственно), и поскольку Т- и В-клетки специфичны и связывают антигены, рецептором Т-клеток обязательно должен быть иммуноглобулин, так же как и рецептором В-клеток. Этот широкий вопрос, имеющий отношение к нашей дискуссии, будет подробнее рассматриваться на сессии 4. Однако, возвращаясь к теме настоящей сессии, если отбросить «догму» (как это мы склонны сделать на основании нашего опыта работы с Н-сцепленными Ig-генами), можно предположить, что основные рецепторы Т-клеток являются не иммуноглобулинами, а продуктом Н-сцепленных Ig-генов.

Действительно, если бы основные рецепторы Т-клеток были иммуноглобулинами, то не было бы различий между специфичностью клеточного и гуморального иммунитета, так как по сути один и тот же набор специфичностей должен был бы проявляться и в Т- и В-клетках. Однако во многих лабораториях получены убедительные указания на то, что между специфичностью клеточных иммунных реакций и специфичностью гуморальных анти-тел действительно существуют различия.

Я не буду углубляться в эти вопросы, так как знаю, что они относятся к некоторым важнейшим темам, которые мы будем обсуждать, когда будут изложены все данные. Тем не менее я хочу с самого начала ясно сформулировать нашу теперешнюю позицию, быть может, даже в слишком решительных выражениях, для того чтобы внести ясность в проблему, прежде чем представить некоторые данные, исходя из которых, мы пришли к соответствующим выводам.

У морских свинок для изучения генетического контроля специфического иммунного ответа использовались инбредные линии 2 и 13, а также рандомбредные животные. Как показано в табл. 2, способность инбредных

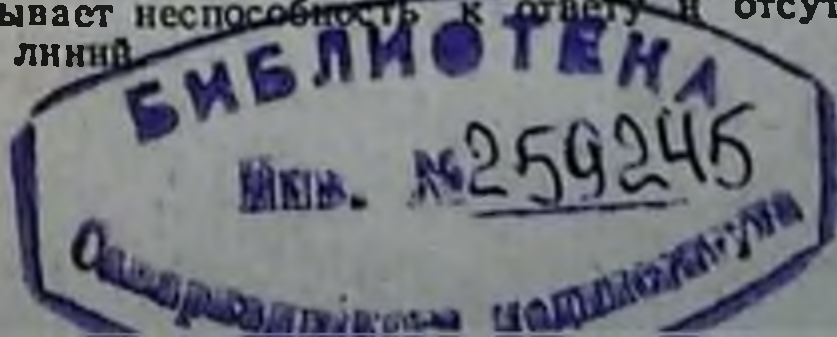
ТАБЛИЦА 2

Наследование специфических Ig-генов и главной системы гистосовместимости морских свинок линий 2 и 13 животными F_1 (2×13) и при возвратном скрещивании

Антигены	Линия		$(2 \times 13) F_1$	$(2 \times 13) F_1 \times 13$		$(2 \times 13) F_1 \times 2$	
	2	13		50% ^a	50%	50%	50%
ДНФ-ПЛЛ-ГЛ	+ ^б	- ^б	+	+	-		
ГА	+	-	+	+	-		
ГТ	-	+	+			+	-
БСА 0,1 мкг	+	-	+	+	-		
ЧСА 1 мкг	+	-	+				
ДНФ-БСА 1 мкг	+	-	+	+	-		
ДНФ-МСА 1 мкг	-	+	+			+	-
Главная система гистосовместимости:							
линия 2		+ ^б	+	+	-		
линия 13			+			+	-

^a В этом столбце одна и та же группа потомков от возвратного скрещивания.

^б + показывает способность к ответу и наличие главных специфичностей гистосовместимости; - показывает неспособность к ответу и отсутствие главных специфичностей гистосовместимости инбредных линий.



морских свинок давать иммунный ответ на синтетические полипептидные антигены, так же как 2,4-динитрофенил-поли-L-лизин (ДНФ-ПЛЛ), полиглутамин-аланин (ГА) и полиглутамин-тирозин (ГТ), и на ограниченные дозы нативных антигенов и их конъюгатов с гаптенами (бычий сывороточный альбумин — БСА, ДНФ-БСА, ДНФ-МАС) наследуется согласно точным законам Менделя. Это означает, что иммунный ответ на антиген контролируется определенными доминантными Ig-генами. Так, животные линии 2, но не линии 13 дают ответ на ДНФ-ПЛЛ, ГЛ, ГА и на низкие дозы БСА, ЧСА и ДНФ-БСА, тогда как на ГТ и ограниченные дозы ДНФ-МАС реагирует линия 13 и не реагирует линия 2. Все гибриды $(2 \times 13)F_1$ отвечают на каждый из этих антигенов, что доказывает доминантный характер иммунного ответа. Способность одновременно отвечать на ДНФ-ПЛЛ, ГА и на низкие дозы БСА и ДНФ-БСА проявляется у 50% потомства от возвратного скрещивания $(2 \times 13)F_1 \times 2$. Рассмотрим теперь, на каких клетках проявляется обсуждаемый нами класс Ig-генов. В двух наиболее изученных системах: гене ПМ у морских свинок и генах области Ig-1 у мышей — способность к иммунному ответу может пассивно передаваться облученным реципиентам неотвечающих линий иммунокомпетентными клетками от животных, способных к ответу. Это доказывает, что Ig-гены действительно проявляются в клетках, участвующих в иммунном ответе. Адаптивный перенос клеток селезенки и лимфатических узлов отвечающих гибридов $(2 \times 13)F_1$ облученным морским свинкам линии 13 (защищенным костным мозгом той же линии) передает способность к клеточному и гуморальному иммунному ответу на ДНФ-ПЛЛ. Следует отметить, что у этих химер реагируют клетки, полученные от донора. Таким образом, Ig-гены проявляются в иммунокомпетентных клетках.

Далее стоит следующий вопрос: в каких иммунокомпетентных клетках обязательно проявляются H-сцепленные гены?

У морских свинок функции, которые в основном приписывают активности клеток «тимусного происхождения», т. е. клеточный иммунитет и функция носителя, зависят исключительно от присутствия соответствующего Ig-гена. Таким образом, реакции клеточного иммунитета на ПЛЛ, ДНФ-ПЛЛ, ГА и ГТ находятся полностью под контролем соответствующих генов специфического иммунного ответа. Их никогда нельзя наблюдать у животных, не имеющих этих генов.

Кроме того, как мы отмечали вместе с Levine, ответ на антигены, контролируемый специфическими генами иммунного ответа, сопровождается образованием антител к гаптенам, которые они несут. Как показано в табл. 3, морские свинки, обладающие геном ПЛЛ, вырабатывают антитела

ТАБЛИЦА 3

Иммунный ответ рандомбредных морских свинок на иммунизацию некоторыми поля-L-лизиновыми конъюгатами с гаптенами, не реагирующими перекрестно

Морские свинки N	5-Диметиламино-1-нафтаген-ПЛЛ	Иммунный ответ на 21-й день		Бензилпенициллин-ПЛЛ
		p-толуолсульфонил-ПЛЛ	2,4-динитрофенил-ПЛЛ	
1—11 12—33	Положительный ^a Отрицательный	Положительный Отрицательный	Положительный Отрицательный	Положительный Отрицательный

^a Положительный ответ характеризуется замедленной гиперчувствительностью к 10 мкг конъюгатов гаптен-ПЛЛ и продукцией антигаптеновых антител.

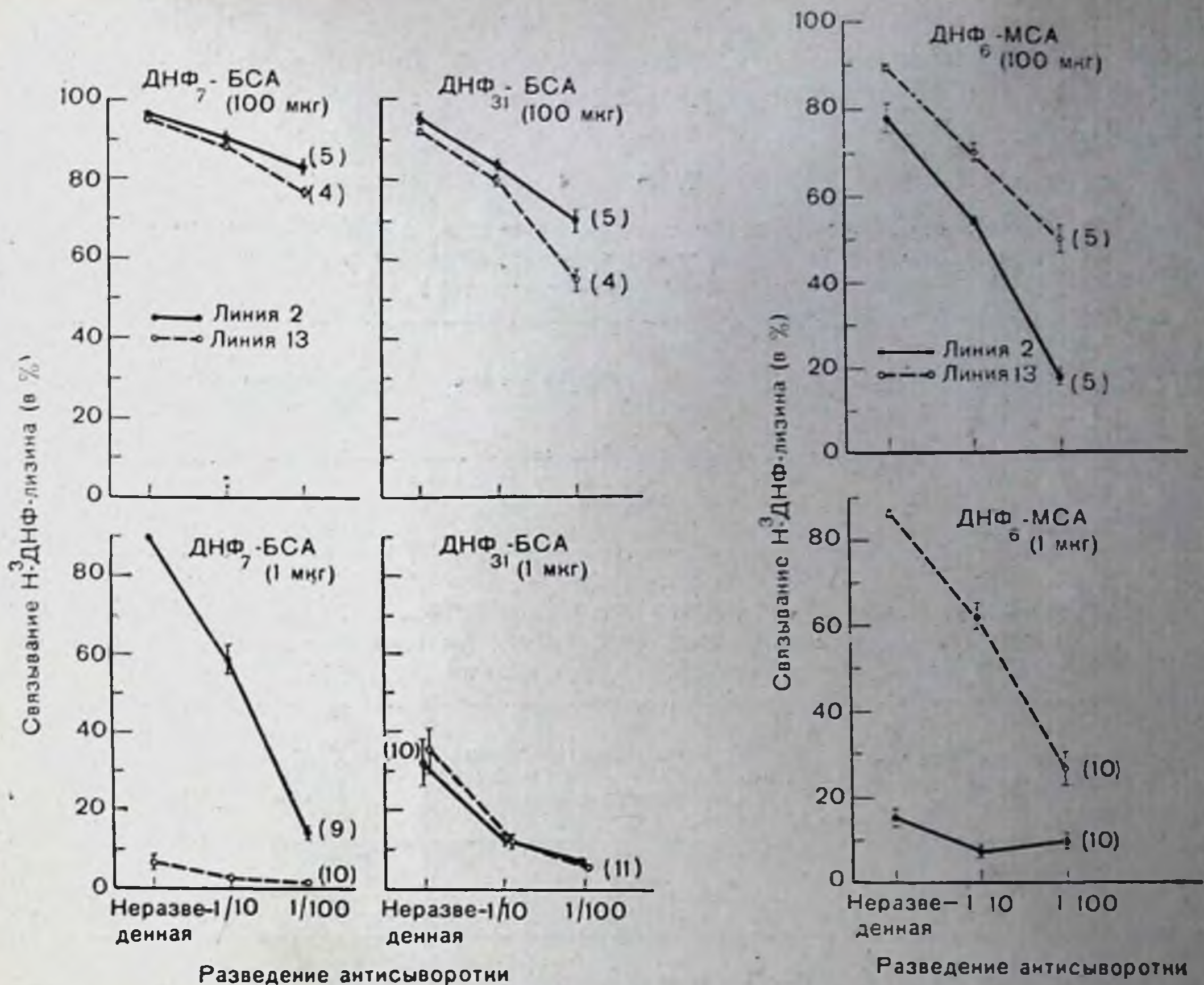


Рис. 1. Анти-ДНФ-антитела в сыворотке морских свинок линии 2 и линии 13 через 3—4 нед после иммунизации 100 мкг или 1 мкг ДНФ₇-БСА или ДНФ₃₁-БСА в полном адъюванте Фрейнда. Данные вычислены в процентах связывания 0,1 мл 10⁻⁸ М-Н³-ДНФ-лизина глобулиновой фракцией 0,1 мл антисыворотки. В скобках — число животных в группе („J. Immunol.“, 1971, v. 107, p. 378).

Рис. 2. Анти-ДНФ-антитела в сыворотке морских свинок линии 2 и линии 13 через 3—4 нед после иммунизации 100 мкг или 1 мкг ДНФ₆-МСА в полном адъюванте Фрейнда („J. Immunol.“, 1971, v 107, p. 328).

к ДНФ. Эти животные отвечают также на иммунизацию конъюгатами ПЛЛ с другими перекрестно не реагирующими гаптенами путем энергичного синтеза антител против гаптенных. Морские свинки, не имеющие гена ПЛЛ и неспособные отвечать на ДНФ-ПЛЛ, не отвечают на benzylpenicilloyl-ПЛЛ и на другие «посторонние» конъюгаты гаптенных с ПЛЛ. Этот опыт доказывает, что ген ПЛЛ связан со специфическим распознаванием молекул носителя, что, как известно, является функцией клеток тимусного происхождения. Когда сенсibilизированные Т-клетки отвечают на носитель ПЛЛ, наблюдается образование антител соединенным с ним гаптенном со стороны специфических В-клеток.

Вместе с Греп аналогичное наблюдение было сделано при изучении генетического контроля синтеза антител к ДНФ с использованием ограниченных доз ДНФ-БСА или ДНФ-МСА (рис. 1 и 2). Как упоминалось ранее (см. табл. 2), линия 2 в отличие от линии 13 синтезирует антитела против ДНФ при иммунизации 1 мкг ДНФ-БСА, тогда как линия 13 в отличие от линии 2 образует антитела к ДНФ при иммунизации 1 мкг ДНФ₆-МСА.

Далее показано, что ответ против ДНФ контролируется специфическими Ig-генами, сцепленными с H-специфичностью линии 2, если вводится ДНФ₇-БСА, и с H-специфичностью линии 13, если вводится ДНФ₆-МСА (табл 4).

ТАБЛИЦА 4

А. Отношение между способностью к ответу на ГТ и присутствием главных антигенов гистосовместимости линии 13 у потомства возвратного скрещивания (2×13) F₁×2

Количество животных, полученных в результате скрещивания (2×13)F ₁ ×2	Клеточный и гуморальный ответ против ГТ	Цитотоксичность против линии 13 ^a , % выделения ⁵¹ Cr
9	++++	32,8
8	—	3,5

Б. Отношение между образованием антител к ДНФ на 1 мкг ДНФ₆-МСА и присутствием главных антигенов гистосовместимости линии 13 у потомства возвратного скрещивания (2×13) F₁×2

Количество животных, полученных в результате скрещивания	% связывания ³ H-ДНФ-лизина антисывороткой (средние цифры и стандартная ошибка)	Цитотоксичность против линии 13 ^a , % выделения ⁵¹ Cr
7	85±4	24,4±2
7	7±3	1,2±6

^a Специфическое выделение ⁵¹Cr из клеток-мишеней лимфатических узлов, инкубированных с аллоантисывороткой линии 2 против линии 13 и компонентом.

Способность к образованию антител против ДНФ в равной мере присуща обоим инбредным линиям, но она детерминируется генетически контролируемым распознаванием специфичности носителя, что опять-таки является функцией клеток тимусного происхождения. Согласно этим данным и их трактовке у морских свинок линии 2 и линии 13, несмотря на различные ответы на ДНФ-МСА, должно иметься одинаковое количество В-лимфоцитов, способных связывать этот антиген. Недавно это было проверено Davie, Gheep и Paul. Данные этих исследователей приведены в табл. 5.

Кроме того, представленные данные и наш вывод об обязательном проявлении H-сцепленных Ig-генов в Т-клетках, связанных со специфичностью

ТАБЛИЦА 5

«Частота» клеток, способных связывать ДНФ₆-МСА у морских свинок линии 2 и 13

Линия	ДНФ-МСА, связывающие клетки на 10 ⁶ лимфоцитов
2	26,2±5,1
13	24,5±4,6

ТАБЛИЦА 6

Иммунный ответ инбредных мышей на ГАТ и H-2-комплекс

H-2	Анти-ГАТ-антитела
a	Высокий
b	»
d	»
k	»
p	Нет антител
s	» »

ДНФ-ПЛЛ⁺ ОВА

БСА⁻

ЧСА⁻

Отвечающие (30%)

Неотвечающие (70%)

Замедленная реакция на
ДНФ-ПЛЛ



Продуцируются анти-
ДНФ-антитела

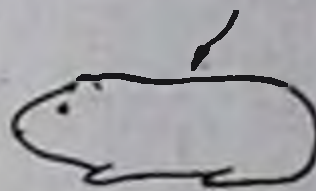
Иммунизация:

ДНФ-ПЛЛ⁺. декстран-
сульфат⁻

Полистирол сульфат⁻

Карбоксиметил
целлюлоза⁻

Отсутствие замедленной реак-
ции на ДНФ-ПЛЛ



Продуцируются анти-
ДНФ-антитела

Иммунизация:

ДНФ-ПЛЛ⁺. гепарин⁻

ДНК⁻

Гиалуроновая кислота⁻

Анти-ДНФ-антитела не продуцируются у неотвечающих животных

Рис. 3. Процедура для демонстрации функции носителя в иммунном ответе на ДНФ-ПЛЛ.

носителя, позволяют предсказать, что если вводить ареативной морской свинке такую неиммуногенную молекулу, как ДНФ-ПЛЛ в комплексе с иммуногенным носителем, способным стимулировать клетки тимусного происхождения, специфические для этого носителя, то можно вызвать синтез антител против ДНФ-ПЛЛ. Именно это наблюдается на практике, как мы отметили много лет назад вместе с Green и Paul. Когда морские свинки линии 13 или линии Hartley, не имеющие гена ПЛЛ, иммунизируются ДНФ-ПЛЛ в комплексе с иммуногенным альбумином, как показано на рис. 3, то большие количества антител против ДНФ вырабатываются при отсутствии клеточного иммунитета. Таким образом, ДНФ-ПЛЛ, служащий иммуногеном у генетически отвечающих животных, может действовать как гаптен у неотвечающих морских свинок. Это подтверждает, что генетический дефект у неотвечающих животных не обусловлен неспособностью синтезировать антитела против каких-то детерминант на молекуле.

Аналогичные результаты были получены также на мышах в системе, разработанной с Martin и Mauger год назад. Ответ инбредных мышей на терполимер L-глутаминовой кислоты, L-аланина и L-тирозина — ГАТ₁₀ находится под генетическим контролем, сцепленным с тканевой совместимостью. Этот полимер особенно важен, так как, в отличие от полимеров, исследованных McDevitt и сотр., генетический контроль антительного ответа на ГАТ₁₀ подчиняется принципу «все или ничего».

Мыши, несущие H-2^a, H-2^b и H-2^d, H-2^k, способны к сильному ответу, тогда как мыши с H-2^p и H-2^s не вырабатывают антител против ГАТ₁₀ (табл. 6).

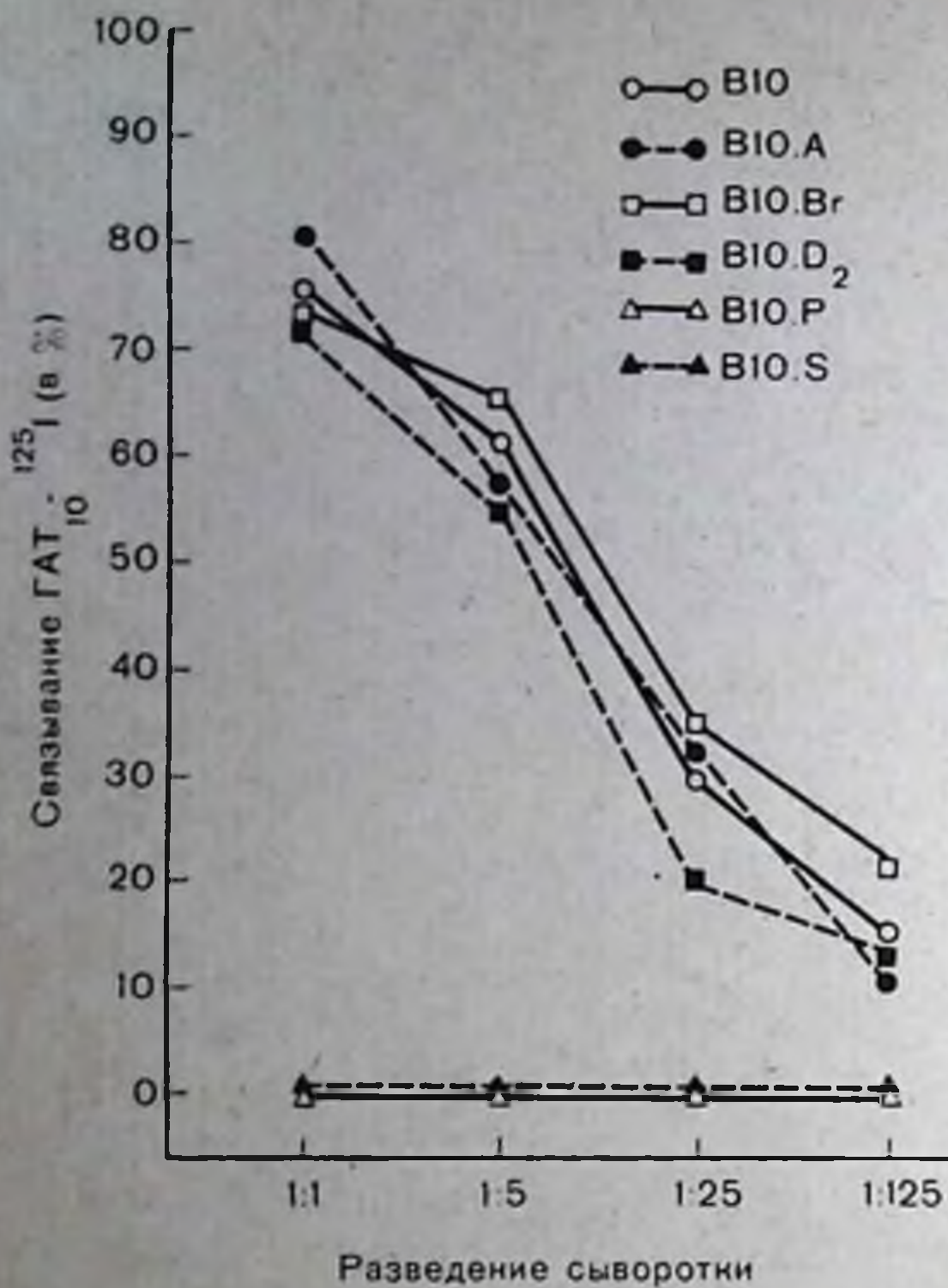


Рис. 4. Связывание $\text{GAT}_{10}\text{-}^{125}\text{I}$ сывороткой в различных разведениях, собранной от конгенных мышей через 3 нед после иммунизации.

щих, так и у неответающих животных характеризовались типичным образованием колпачков в случае контакта с антигенами при комнатной температуре или при температуре 37°C . Неответающих мышей SJL можно было также заставить синтезировать антитела против GAT после иммунизации GAT_{10} в комплексе с метилированным альбумином в опытах Мацгер и Меггутап, что подтвердилось в нашей лаборатории.

Как показано на рис. 4, это было проверено в опытах с мышами на генетической основе BIO, различающимися только по комплексу H-2. Учитывая тот факт, что мыши H-2^s, например SJL, абсолютно не способны к ответу на GAT_{10} , было интересно установить, можно ли найти у этих мышей клетки, связывающие GAT_{10} , и можно ли у мышей SJL индуцировать образование антител против GAT_{10} путем иммунизации GAT_{10} на антигенном носителе.

В табл. 7 сравнивается количество клеток, связывающих GAT_{10} в селезенке отвечающих мышей A/HeLa и неответающих мышей SJL. Эти данные получены совместно с Dupham и Ulaniec. У обеих линий содержится одинаковое количество клеток, связывающих антиген. Кроме того, количество этих клеток увеличивается при иммунизации только в селезенке отвечающих животных. Я хотел бы добавить также, что клетки, связывающие GAT_{10} , как у отвечающих,

ТАБЛИЦА 7

Клетки, связывающие ^{125}I - GAT в селезенке отвечающих (A/He Na) и неответающих (SJL) мышей

Группы мышей	Связывающие клетки/ 10^4	
	нормальные	иммунизированные ^a
Отвечающие A/He/Na	3,2	8,9
Неответающие SJL	8,3	7,9

^a Иммунизированные 100 мкг GAT в квасцах предварительно за 7 и 8 нед.

Весьма интересное свойство H-цепленных Ig-генов морских свинок, изученное нами, — это их проявление как у инбредных линий, так и у некоторого процента рандомбредных животных. Это позволяет установить, в какой степени сцепление между данным Ig-геном и основными специфич-

ностями гистосовместимости инбредной линии сохраняется у рандомбредных морских свинок, или, иными словами, в какой степени типирование по гистосовместимости позволяет прогнозировать ответ отдельных рандомбредных животных на антигены. Несомненно, это будет зависеть от того, насколько тесно сцепление между данным Ig-геном и локусом, контролирующим специфичности гистосовместимости. Результаты подобного исследования приведены в табл. 8.

ТАБЛИЦА 8

Отношение между наличием ПЛЛ-гена (показано способностью к ответу на ДНФ-ПЛЛ) и присутствием специфичностей гистосовместимости линии 2 у рандомбредных морских свинок

Средний % выделения ^{51}Cr под действием $1/6$ аллоантисыворотки против линии 2 и комплемента			
морские свинки Hartley		рандомбредные морские свинки Национального института здравоохранения (НИЗ)	
42 ДНФ-ПЛЛ-отвечающие 27,2	36 ДНФ-ПЛЛ-неотвечающие 0,3	1 ДНФ-ПЛЛ-отвечающие 51	14 ДНФ-ПЛЛ-неотвечающие 0,2

Hartley были исследованы 78 рандомбредных морских свинок (42 животных, отвечающих на ПЛЛ, и 36 неответающих) на присутствие специфичностей линии 2 на их лимфоцитах при помощи аллоантисыворотки против линии 2, полученной у морских свинок линии 13. У всех без исключения этих животных наличие гена ПЛЛ всегда сочеталось с лизисом клеток антисывороткой против линии 2 в присутствии комплемента. Напротив, клетки животных, не имеющих ПЛЛ, не лизировались этими антисыворотками.

Аналогичные результаты были получены с рандомбредными морскими свинками из Национального института здравоохранения. Таким образом, имеется полная ассоциация между геном ПЛЛ и H-специфичностями линии 2 у рандомбредных животных. Эта абсолютная связь не относится к гену GA, который сочетается с геном ПЛЛ, а следовательно, со специфичностями линии 2 только в 90% случаев, или к гену ЧСА, имеющему значительно меньшую частоту ассоциации.

Таким образом, мы полагаем, что получили весьма убедительные данные, говорящие о проявлении H-сцепленных Ig-генов в T-клетках.

Существуют также очень убедительные, поддерживающие эту мысль, данные, полученные Grumet с McDevitt и Mitchell, которые будут приведены ниже.

Следующая проблема, заслуживающая внимания, — это характер процесса контролируемого генами. Мы полагаем, что H-сцепленные Ig-гены контролируют специфическое распознавание определенных антигенов T-клетками. Для того чтобы выполнять эту функцию, генный продукт должен проявляться либо внутри T-клетки, либо на их поверхности. Мы считаем также, что недавние опыты Shevach, Paul и Green, о которых далее расскажет Green, убедительно доказывают, что специфический генный продукт проявляется как антигенный рецептор на поверхности T-клеток. Поэтому мы полагаем, что, судя по имеющимся данным, H-сцепленные Ig-гены влияют на способность тимусных клеток связывать специфические антигены или реагировать с ними.

Проявляются ли эти H-сцепленные Ig-гены также на В-клетках, т. е. на предшественниках клеток секретирующих антитела?

Мы знаем, что эти клетки совершенно точно имеют иммуноглобулиновый рецептор. Однако имеющиеся данные подсказывают, что каким-то таинственным пока образом в некоторых системах H-сцепленные Ig-гены в известной мере, по-видимому, определяют специфичность продуцируемой популяции антител.

Это наблюдение сделали McDevitt и соавт., изучавшие ответ на разветвления кополимеров, а также мы на морских свинках, изучая ответ беспородных животных на ГАТ₁₀. Этот антиген, который является иммуногеном только для некоторых линий мышей, всегда иммуногенен для морских свинок, как показано в табл. 9. Однако специфичность вырабатываемых

ТАБЛИЦА 9
Ответ на ГАТ

Линия	Доза антигена, мкг	Количество животных	Клеточный иммунитет	Связывание антигена: средние цифры (в %) и стандартная ошибка
2	100	7	+++	72,6 (5,7)
13	100	10	+++	49,0 (4,6)
Hartley	100	19	+++	76,5 (2,2)
Coulson	100	8	+++	72,8 (3,9)
Морские свинки Национального института здравоохранения (США)	100	26	++	—

антител может быть различна у разных животных в зависимости от их генетического статуса, как показано в табл. 10. Можно полагать, что ГАТ₁₀ имеет последовательности ГА и ГТ наряду со специфическими детерминантами ГАТ₁₀. Беспородные морские свинки, иммунизированные ГАТ₁₀ и имеющие ген ГА, проявляют замедленную гиперчувствительность к ГА в отличие от свинок, лишенных этого гена. Однако особенно интересно то, что значительное связывание ГА наблюдается лишь у морских свинок, имеющих ген ГА, независимо от образуемых титров антител против ГАТ.

Мы должны также подчеркнуть, что это влияние H-сцепленных Ig-генов на специфичность вырабатываемых антител наблюдается не в каждой системе. Например, у животных отвечающих и не отвечающих на ГТ, при иммунизации ГАТ можно отметить одинаковое связывание ГТ.

ТАБЛИЦА 10

Отношение между клеточным иммунитетом к ГА у морских свинок Hartley, иммунизированных ГАТ, и специфичностью антител против ГА в их сыворотке

Клеточный иммунитет к ГА	Количество животных	Анти-ГА, связывание антигена, %	Анти-ГАТ, связывание антигена, % ^a
+	9	22,9 (6,8)	79,2 (2,8)
—	10	4,7 (1,7)	74 (3,2)

^a Среднее значение и в скобках — стандартная ошибка.

Влияние H-сцепленных Ig-генов на специфичность вырабатываемой популяции антител, можно объяснить по-разному: 1) эти гены могут проявляться также на поверхностях В-клеток и в какой-то мере влиять на специфичность связывания антигена иммуноглобулиновыми рецепторами; 2) согласно другому предположению, гены могут влиять на специфичность антител, определяя каким-то неизвестным образом эффективность специфического взаимодействия Т- и В-клеток.

В табл. 11 мы приводим две основные гипотезы, которые, по нашему мнению, могут объяснить, какой же процесс кодируется H-сцепленными

ТАБЛИЦА 11

Альтернативные гипотезы о природе продукта,
связанного с H-локусом Ig-гена

-
1. Продукты этих Ig-генов являются другой важной системой распознавания (отличающейся от иммуноглобулинов) для клеток тимусного происхождения.
 2. Они косвенно влияют на взаимодействие между антигеном и иммуноглобулиновыми рецепторами на иммунокомпетентных клетках.
-

специфическими Ig-генами: 1) продукт этих генов представляет собой другую систему распознавания, отличающуюся от иммуноглобулинов, у Т-клеток; сейчас мы склоняемся к этому мнению; 2) продукт генов косвенно влияет на взаимодействие иммуноглобулиновых рецепторов с антигеном или на взаимодействие между иммунокомпетентными клетками обоих классов. Следовательно, очень важно доказать, что Т-клетки действительно связывает антиген через посредство иммуноглобулиновых рецепторов. Пока это еще не доказано. Естественно, я надеюсь что в результате наших дискуссий удастся избрать одну из этих гипотез.

Cohn. Пытались вы когда-либо найти антитела против самого ПЛЛ?

Benacerraf. Да, мы убедили Levine, разработавшего чрезвычайно чувствительный метод связывания комплемента, провести такие определения. При помощи его метода было установлено, что у животных, иммунизированных полилизинном (что вызывало замедленную гиперчувствительность), никогда не вырабатывались антитела против него. Могу добавить, что этот же результат был получен также другими способами.

Cohn. Я хотел бы спросить Benacerraf, вырабатывались ли у этих животных антитела против ПЛЛ, если он был конъюгирован с носителем-белком?

Benacerraf. Не помню изучали ли мы этот вопрос, но быть может на него ответит Green.

Green. Насколько я помню, мы не ставили опыта, о котором говорит Cohn. Мы только проверяли путем связывания комплемента сыворотку животных, иммунизированных одним ПЛЛ.

Bodmer. Получали ли вы морских свинок для этих опытов из самых различных источников? Иными словами: сколько разных типов животных вы использовали?

Benacerraf. Мы пользовались совершенно различными, неинбредными морскими свинками. Я не знаю их точного происхождения. Знаю только, что они были получены из большого питомника.

Bodmer. Однако очень важны размеры основного стада.

Benacerraf. У меня нет конкретных сведений об этом. Все домашние морские свинки происходят от относительно небольшого количества предков. Однако я могу сказать, что чистота гена ПЛЛ у животных породы

Hartley равна примерно 30%. Следовательно, они, вероятно, гетерозиготны. Это открывает весьма широкие возможности для кроссинговера. Однако этого не наблюдалось для гена ПЛЛ и Н-специфичностей линии 2. Это относится не ко всем антигенам, например, способность отвечать на ГА и на низкие дозы БСА присуща животным линии 2, так же как и ответ на ПЛЛ. Но ответы первого рода не сцеплены со способностью отвечать на ПЛЛ или с Н-специфичностями линии 2 у всех беспородных животных. Таким образом, происходит какая-то рекомбинация между геном ГА и Н-специфичностями линии 2.

Serpellini. Но Вепасеггаф только что говорил, что эти гены не всегда ассоциированы на уровне популяции.

Вепасеггаф. Два из них действительно сочетаются в аутобредной популяции, но эта ассоциация не абсолютна.

Serpellini. Если я правильно понял Вепасеггаф, он утверждает, что некоторые из этих иммунных ответов на разные антигены наследуются как единое целое у инбредных линий, но могут быть не связаны у отдельных аутобредных животных. Я хочу сказать, что хотя ассоциация (положительная или отрицательная) между двумя признаками на уровне популяции указывает на тесное сцепление (хотя и не доказывает его), то отсутствие ассоциаций отнюдь не говорит против сцепления. Единственно доказательной проверкой сцепления является анализ расщеплений. Кроме того, если выяснится, что при расщеплении разные иммунные ответы иногда разделяются кроссинговером, то это будет единственным доказательством того, что они контролируются разными, хотя и соседними последовательностями нуклеотидов и будет опровергнута другая гипотеза о том, что они являются результатом плеiotропного действия одного и того же Iг-аллеля.

Председатель Simonsen. Вепасеггаф предоставил Греен завершить общее вступление к нашей сессии. И теперь мы слушаем его.

Греен. Я хотел бы обсудить здесь, как можно рассматривать действие антигенов гистосовместимости на поверхности клеток. Опыты, о которых я расскажу, были проведены вместе с Shevach и Paul в Национальном институте здравоохранения. Мы решили изучить следующую модель: влияние антител против гистосовместимости (аллоантисывороток) на один аспект клеточного иммунитета, обычно изучаемый иммунологами, а именно бласттрансформацию лимфоцитов *in vitro* под действием антигена. Мы избрали два антигена: ДНФ-ГЛ и ГТ. Ответы на эти антигены контролируются генетически, как уже говорил здесь Вепасеггаф. В табл. 12 показано сцепле-

ТАБЛИЦА 12

Отношение между типом гистосовместимости и иммунным ответом к ДНФ-ГЛ у инбредных морских свинок

Линия	Тип гистосовместимости	ДНФ-ГЛ ответ	ГТ ответ
2	2/2	+	-
13	13/13	-	+
F ₁	2/13	+	+
F ₁ × 2	{ 2/2	+	-
	{ 2/13	+	+
F ₁ × 13	{ 2/13	+	+
	{ 13/13	-	+

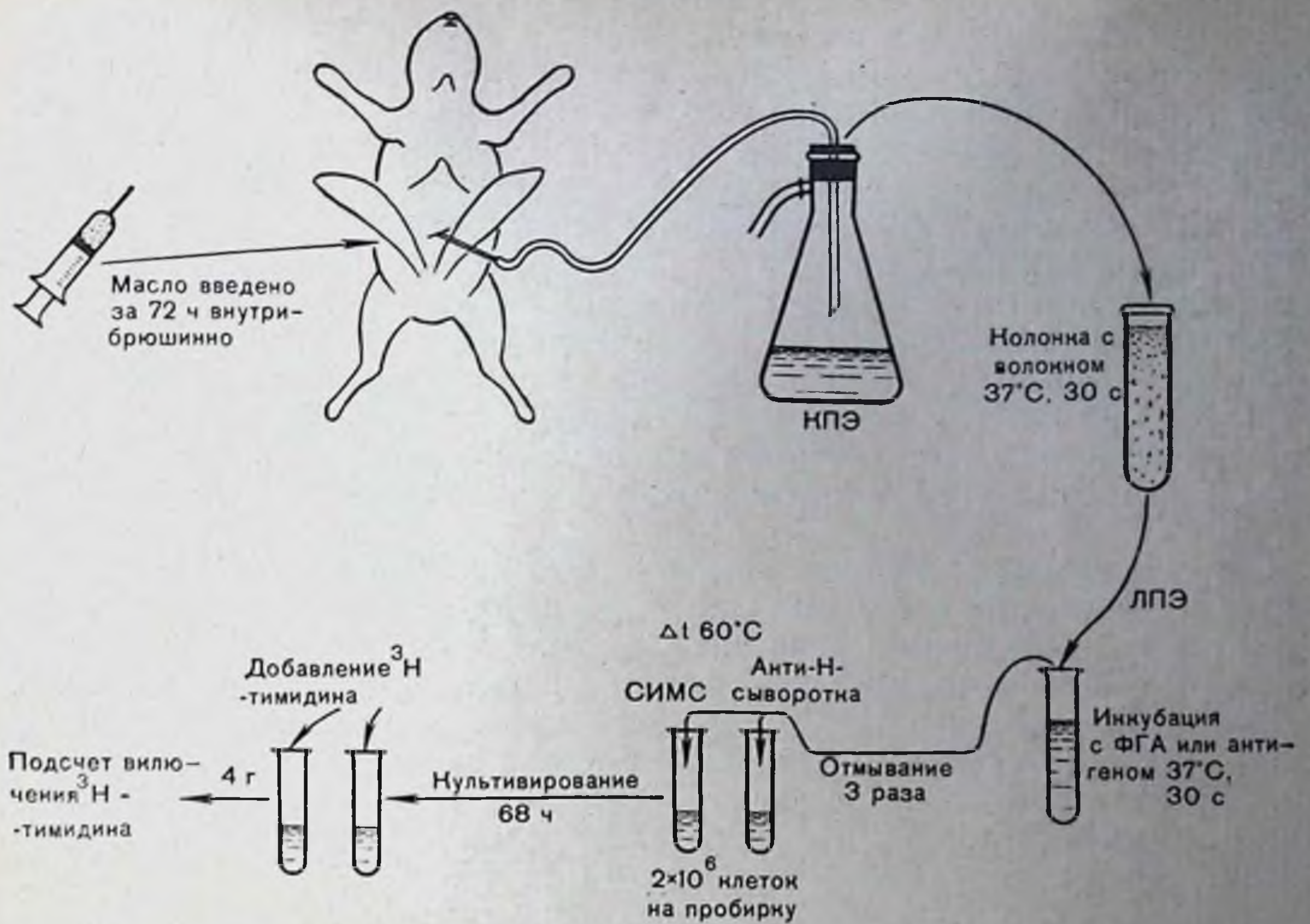


Рис. 5. Общая схема получения и культивирования лимфоцитов перитонеального экссудата (в/б — внутрибрюшинно, КПЭ — клетки перитонеального экссудата, ЛПЭ — лимфоциты перитонеального экссудата, СИМС — сыворотка интактных морских свинок).

ние антигенов гистосовместимости с иммунным ответом на ДНФ-ГЛ и ГТ. Линия 2 отвечает на ДНФ-ГЛ, линия 13 — на ГТ. Гибриды F_1 , несущие оба антигена гистосовместимости, отвечают на оба антигена. Путем анализа возвратного скрещивания, рассмотренного ранее, мы доказали, что антиген гистосовместимости линии 2 сцеплен с ответом на ГЛ, а антиген гистосовместимости линии 13 — с ответом на ГТ. План опыта показан на рис. 5. Я должен со всей откровенностью признаться, что опыты этого рода ранее поставить пытались другие исследователи, но к сожалению, без особого успеха. Теперь я думаю, что нам повезло благодаря информации, полученной лишь несколько месяцев назад в Национальном институте здравоохранения от наших коллег Rosenstreich и Rosenthal. Они доказали, что лимфоциты перитонеального экссудата морских свинок обладают весьма интересным свойством; они сильнее отвечают на антигенную стимуляцию *in vitro*. Эти экссудаты состоят примерно из 70% моноцитов и 30% лимфоцитов. При работе с этими перитонеальными клетками, когда мы отделяем лимфоциты от моноцитов на волоконной колонке, получается популяция лимфоцитов которая значительно более чувствительна к антигенной стимуляции *in vitro*, чем клетки, взятые из лимфатических узлов. Следовательно, пользуясь этими клетками, можно достигнуть большей антигенной стимуляции, чем при работе с лимфоцитами лимфатических узлов, которые прежде применялись для опытов этого рода.

В обсуждаемых опытах мы получали эти лимфоциты перитонеального экссудата, инкубировали их с антигеном или ФГА в течение 30 мин при 37°C и затем отмывали не прикрепившийся антиген или митоген.

Я хочу здесь также упомянуть, что эти взвеси лимфоцитов перитонеального экссудата все же содержат примерно 2—3% моноцитов и, видимо, эти моноциты необходимы для того, чтобы реакция началась. Однако подавляющее большинство клеток является лимфоцитами.

Затем мы добавляем сыворотку нормальных морских свинок или алло-антисыворотку, которую нагреваем, чтобы исключить действие комплемента. Сыворотки против линии 2 либо линии 13 получают, например, путем иммунизации животных линии 2 селезенкой или лимфатическими узлами линии 13 в полном адьюванте Фрейнда. Затем для «подкрепления» иммунизации животным вводят клетки лимфатических узлов или селезенки в смеси с неполным адьювантом и спустя 4—6 нед получают антисыворотки. Кроме того, сыворотки нагревают, чтобы они не были цитотоксичными. Клетки культивируют *in vitro* 72 ч, и включение ³H-тимидина определяют обычным методом.

В табл. 13 показано влияние антисыворотки, полученной на линии 13 против линии 2, на инбредных животных линии 2. Приведенные числа являются необработанными данными. Следует отметить, что эти животные, иммунизированные полным адьювантом Фрейнда, чувствительны к РРД. Добавление антисыворотки 13 анти-2 в высокой концентрации полностью снимает ответ на ДНФ-ГЛ. При более высоких разведениях антисыворотки эффект менее выражен. Следует отметить, что значительно изменяется также ответ на РРД, тогда как ответ на ФГА изменяется лишь в умеренной степени.

ТАБЛИЦА 13

Подавление бласттрансформации антисывороткой 13 анти-2 у инбредных животных линии 2, иммунизированных ДНФ-ГЛ^а

Стимуляция	Норма	Сыворотка		
		13 анти-2	13 анти-2 (1:2)	13 анти-2 (1:10)
0	546	489	217	300
ДНФ-ГЛ	13 409	380	466	1 937
РРД	31 917	2 383	6 532	8 904
ФГА	37 152	15 979	13 967	18 787

^а ДНФ-ГЛ в полном адьюванте Фрейнда.

ТАБЛИЦА 14

Подавление бласттрансформации антисывороткой 2 анти-13 у инбредных животных линии 13, иммунизированных ГТ^а

Стимуляция	Сыворотка	
	нормальная	2 анти-13
0	466	599
ГТ	3,612	320
РРД	14,807	387
ФГА	29,001	10,934

^а ГТ в полном адьюванте Фрейнда.

Когда ставится обратный опыт (табл. 14), т. е. когда изучается влияние антител против линии 13 на ответ на ГТ in vitro, то мы видим, что антисыворотка против линии 13 полностью снимает пролиферативный ответ на ГТ. В этом случае снимается также ответ на РРД, тогда как ответ на ФГА подавляется в меньшей степени (см. табл. 14).

Общие результаты 3 опытов у морских свинок линий 2 и 13 приведены в табл. 15. В этом случае мы решили пересчитать результаты по отношению к ответу на ФГА, т. е. ответ на ФГА принимается за 1 и все остальные цифры указаны из расчета относительно этой единицы. Ясно, что антисыворотка линии 13 против линии 2 снимает ответ на ДНФ-ГЛ, а также значительно ослабляет ответ на РРД. В обратном опыте с антисывороткой линии 2 против линии 13 ответ на ГТ в большой мере снимается, а ответ на РРД ослабляется еще больше, чем ответ на ГТ. Однако самые убедительные опыты были проведены на гибридах F₁, иммунизированных против ДНФ-ГЛ и ГТ одновременно. В табл. 16 показаны результаты одного опыта на гибридах F₁. Мы видим, что антисыворотка против линии 2 полностью подавляет ответ на ДНФ-ГЛ, но очень мало влияет на ответ к ГТ.

ТАБЛИЦА 15

Подавление пролиферации лимфоцитов сывороткой против антигенов гистосовместимости^a

Стимуляция	Животные линии 2		Процент подавления
	сыворотка:		
	нормальная	13 анти-2	
0	0	0	
ДНФ-ГЛ	0,63 ± 0,14	0,08 ± 0,05	87
РРД	0,94 ± 0,08	0,46 ± 0,18	51
ФГА	1,00	1,00	
Стимуляция	Животные линии 13		Процент подавления
	сыворотка		
	нормальная	2 анти-13	
0	0	0	
ГТ	0,21 ± 0,05	0,07 ± 0,04	67
РРД	0,72 ± 0,14	0,11 ± 0,11	85
ФГА	1,00	1,00	

^a В таблице суммированы данные трех экспериментов: данные приведены в виде отношения к ответу на ФГА, который принят за единицу: $\frac{\text{имп/мин с Ag} - \text{имп/мин без Ag}}{\text{имп/мин с ФГА} - \text{имп/мин без Ag}}$

Обратная картина наблюдалась в опыте с антисывороткой против линии 13, которая очень мало ослабляла ответ на ДНФ-ГЛ, но значительно ослабляла ответ на ГТ. Особенно интересно, что у животных F₁-ответ на РРД снижается не в такой же степени, как у животных линии 2 и 13. Иными словами, у гибридов F₁-ответ на РРД изменяется значительно меньше, чем у животных линии 2 или 13. В нижней части таблицы сила ответа дана в виде отношения к ответу на ФГА. Здесь мы видим, что антисыворотка против линии 2 полностью снимает ответ на ДНФ-ГЛ, антитела против линии 13 полностью снимают ответ на ГТ. И в этом случае ответ на РРД почти не меняется. Однако, когда используется смесь антисывороток против линий 2 и 13, то подавляются все ответы на ГТ, ДНФ-ГЛ и РРД.

Подавление пролиферации лимфоцитов сывороткой против антигенов гистосовместимости у животных (2×13) F₁

Стимуляция	Нормальная сыворотка	Анти-2	Анти-13	Анти-2 + анти-13
0	3,499	1,479	1,484	1,494
ДНФ-ГЛ	68,361	1,231	46,385	2,178
ГТ	17,070	12,147	1,770	3,793
PPD	20,049	12,086	15,159	4,344
ФГА	56,887	44,281	28,094	34,943

По отношению к ответу на ФГА

0	0	0	0	0
ДНФ-ГЛ	1,21	0	1,69	0,02
ГТ	0,25	0,25	0,01	0,07
PPD	0,36	0,25	0,51	0,09
ФГА	1,00	1,00	1,00	1,00

На рис. 6 показаны результаты 4 опытов с гибридами F₁. Опять-таки изображены пролиферативные ответы в присутствии нормальных сывороток или аллоантисывороток. Антисыворотка против линии 2 снимает ответ на ДНФ-ГЛ, а ответ на ГТ и PPD остается на прежнем уровне. Наоборот, антисыворотка линии 2 против линии 13 не влияет на ответ на ДНФ-ГЛ, но снимает ответ на ГТ; и здесь она почти не повлияла на ответ на PPD.

Прежние исследования нашей лаборатории показали, что в этих системах кроличья антисыворотка к иммуноглобулинам морских свинок совершенно не влияет на ответ *in vitro* на ДНФ-МСА.

Далее я хотел бы подчеркнуть, что эти антисыворотки против антигенов гистосовместимости были абсорбированы как на колонках, содержащих иммуноглобулин, так и на колонках, содержащих антиген ДНФ-ГЛ. Эта обработка совершенно не повлияла на способность аллоантисывороток блокировать специфический иммунный ответ *in vitro*. Подобный контроль дает нам уверенность в том, что мы, очевидно, имеем дело с какими-то перекрестно реагирующими антителами против специфического антигена и не с антителами, которые вступают в перекрестную реакцию с иммуноглобулином морской свинки.

В заключение я хотел бы сказать, что, по нашему мнению, эти опыты доказывают, что продукт Ig-гена находится на поверхности клеток тимусного происхождения и расположен близ сайтов, занятых антигенами гистосовместимости.

Вепасеггаф. Делая этот вывод, Грееп проявил очень большую осторожность, которая вообще ему свойственна. Однако этот опыт может получить и другое объяснение. Возможно что аллоантисыворотки, способные подавлять *in vitro* иммунный ответ у животных F₁, действительно направлены к продукту самого Ig-гена, а не только к специфичностям гистосовместимости. Я особенно подчеркиваю эту возможность, так как данные антисыворотки были получены при помощи лимфоцитов. С другой стороны, возможно, они действуют так, как считает Грееп, если взять на себя смелость допустить, что рецепторы на тимоцитах находятся с антигенами гистосовместимости в связи, аналогичной отношению переменных областей иммуногло-

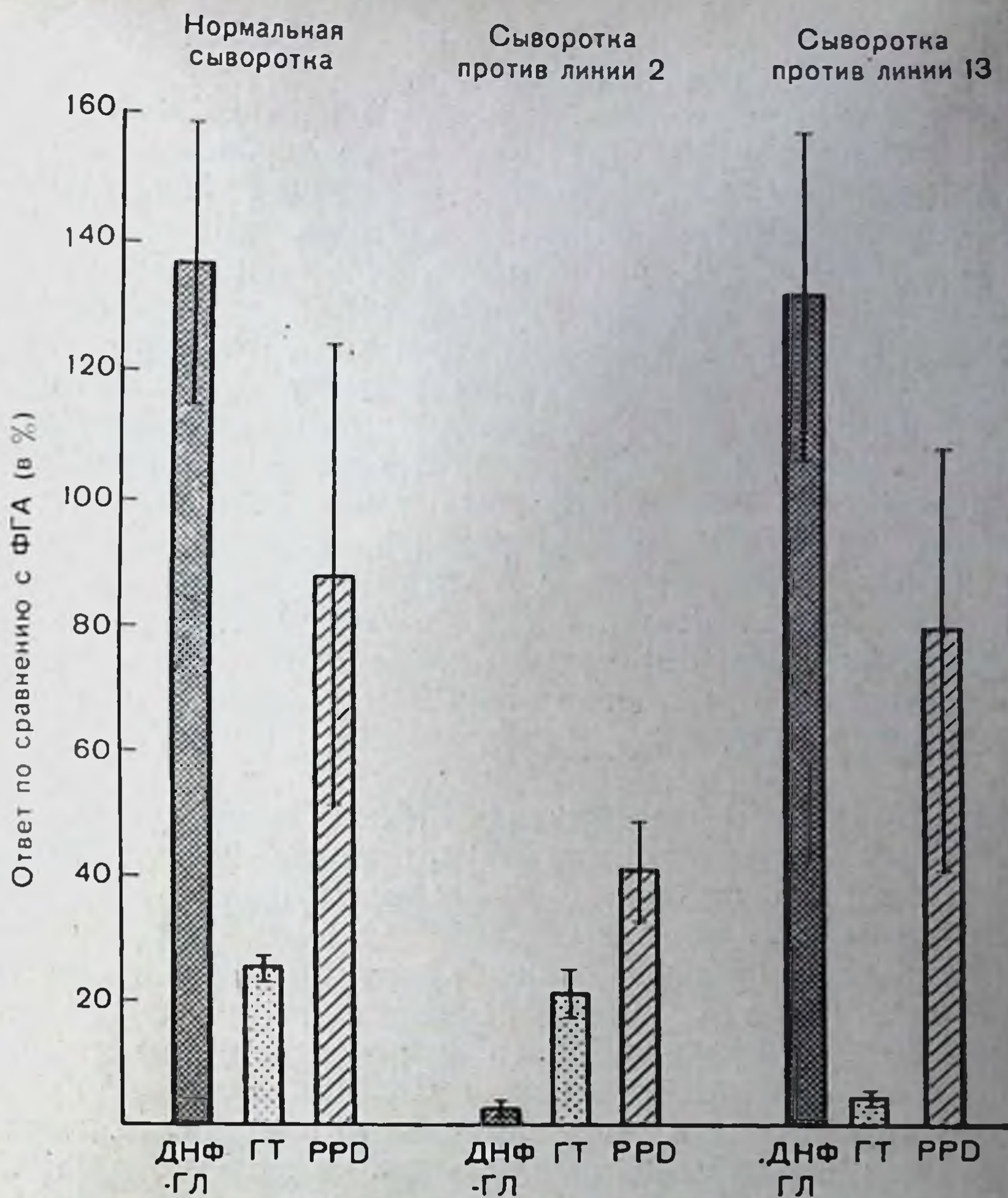


Рис. 6. Ингибция индуцированной антигеном пролиферации лимфоцитов перитонеального экссудата морских свинок (13×2), сывороткой против антигенов гистосовместимости. Результаты вычислены по отношению к реакции на ФГА. Каждый столбик — средняя арифметическая 4 экспериментов ± стандартная ошибка средних.

булина к константной области, т. е. они могут быть частью одной и той же молекулы.

Председатель Simonsen. Теперь, когда мы познакомились с наблюдениями Green, а также с тем, как трактует эти вопросы Venesegraf, перед нами остались еще три темы для обсуждения, а именно: продукт Ig-гена, рецептор Т-клеток и антиген гистосовместимости. Самый главный вопрос — это характер соотношения между этими тремя «субстанциями», если какое-то соотношение вообще существует. Venesegraf склоняется к мысли, что продукт Ig-гена равнозначен рецептору Т-клеток. Кроме того, возможно, что рецептор Т-клеток сам является антигеном гистосовместимости и, наконец, возможно, что продукт Ig-гена представляет собой антиген гистосовместимости. Возможно, что справедливо только одно из трех предположений, а два других неверны. Однако, если верны два предположения, то должны быть справедливы все три.

В настоящее время основная помеха состоит в том, что химическая структура этих рецепторов, имеющих решающее значение, очень мало известна, структура Ig-продукта совсем неизвестна. Некоторые из нас полагают, что

столь же неизвестна и химическая структура рецепторов Т-клеток, другие же считают, что это иммуноглобулин IgM.

Главные антигены гистосовместимости, по крайней мере H-2 и HL-A представляют лишь одну из трех упомянутых субстанций, химическую структуру которой мы начали изучать. Однако мы не знаем, может ли «Н-компонент» подобно иммуноглобулинам состоять из постоянной и вариабельной части молекулы. Если это так, то антигенные детерминанты, которые мы называем антигенами гистосовместимости, могут быть весьма сходны с аллотипами на молекулах иммуноглобулинов.

Эксперименты по блокированию, описанные Green, весьма точно совпадают с нашими результатами, полученными в опытах, в которых мы попытались заблокировать реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) у куриных эмбрионов. Мы смогли обеспечить полную блокировку, пользуясь F(ab) фрагментами антител, направленных против антигенов гистосовместимости контролируемых локусом В-отвечающих клеток (см.: Grove, Koch, Simonsen. Неуловимый рецептор Т-клеток. — «Transp. Rev.», 1972, 10, 36). Надо заметить, что Serpellini и соавт. ранее сделали аналогичное наблюдение в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) и в опытах с бласттрансформацией, вызванной PPD. Быть может, он хотел бы выступить по этому вопросу.

Serpellini. Со стороны председателя Simonsen весьма любезно обратиться ко мне с просьбой оценить опыты Green. Я считаю, что эта работа весьма важна. По существу сходные результаты мы опубликовали уже два года тому назад. С самого начала мы сознавали их значение в смысле возможности новой трактовки природы Ig-генов (Serpellini, Miggiano, Pellegrino. — «Transpl. Proc.», 1971, v. 3, p. 63). Мы заметили, что антисыворотки человека, полученные при неоднократных переливаниях крови могли в отсутствии комплемента подавлять активацию в СКЛ, если они были направлены против стимулирующих клеток (обработанные митомицином С в однонаправленной СКЛ) или против отвечающих клеток. Подавление ответа лимфоцитов наблюдалось также в опытах с туберкулином, столбнячным анатоксином и даже с субоптимальными дозами ФГА. Эта блокада не сопровождалась потерей всей жизнеспособности, судя по пробе с «выключением» краски и по включению ³H-тимидина после отмывания и стимуляции оптимальными дозами ФГА.

На рис. 7 показано, что как мы трактуем подавление в двух этих случаях (антисыворотки против стимулирующих или против отвечающих клеток). В первом случае аллогенные антитела покрывают (как одеялом) антигенные структуры на клетках-мишенях, ответственные за активацию отвечающих клеток. Во втором случае антитела как «стереопомеха», препятствуют рецепторным структурам, с помощью которых отвечающие клетки распознают стимулирующий антиген.

Эта схема безусловно наивна и теперь, когда прошел год после ее создания, уже нуждается в поправках. Теперь мы полагаем, что блокада связана с агрегацией компонентов клеточных мембран в виде «пятен». Клетки могут восстановиться после воздействия антисыворотки путем эндоцитоза и сбрасывания этих комплексов (Bernoso, Mattiuz, Miggiano, Serpellini. — «G. Batt, Virol. Immunol.», 1971, v. 66, p. 316). В настоящее время из работы Taylor, Pernis и Prud'homme и из наших собственных исследований мы знаем, что иммунорецепторы В-клеток не сцеплены физически на клеточной мембране с известными антигенами H-2 или HL-A. Однако в системе, описанной Green, а также в нашей системе участвуют Т-клетки. Следовательно, пока еще не отвергнуто наличие тесной связи между H-структурами и

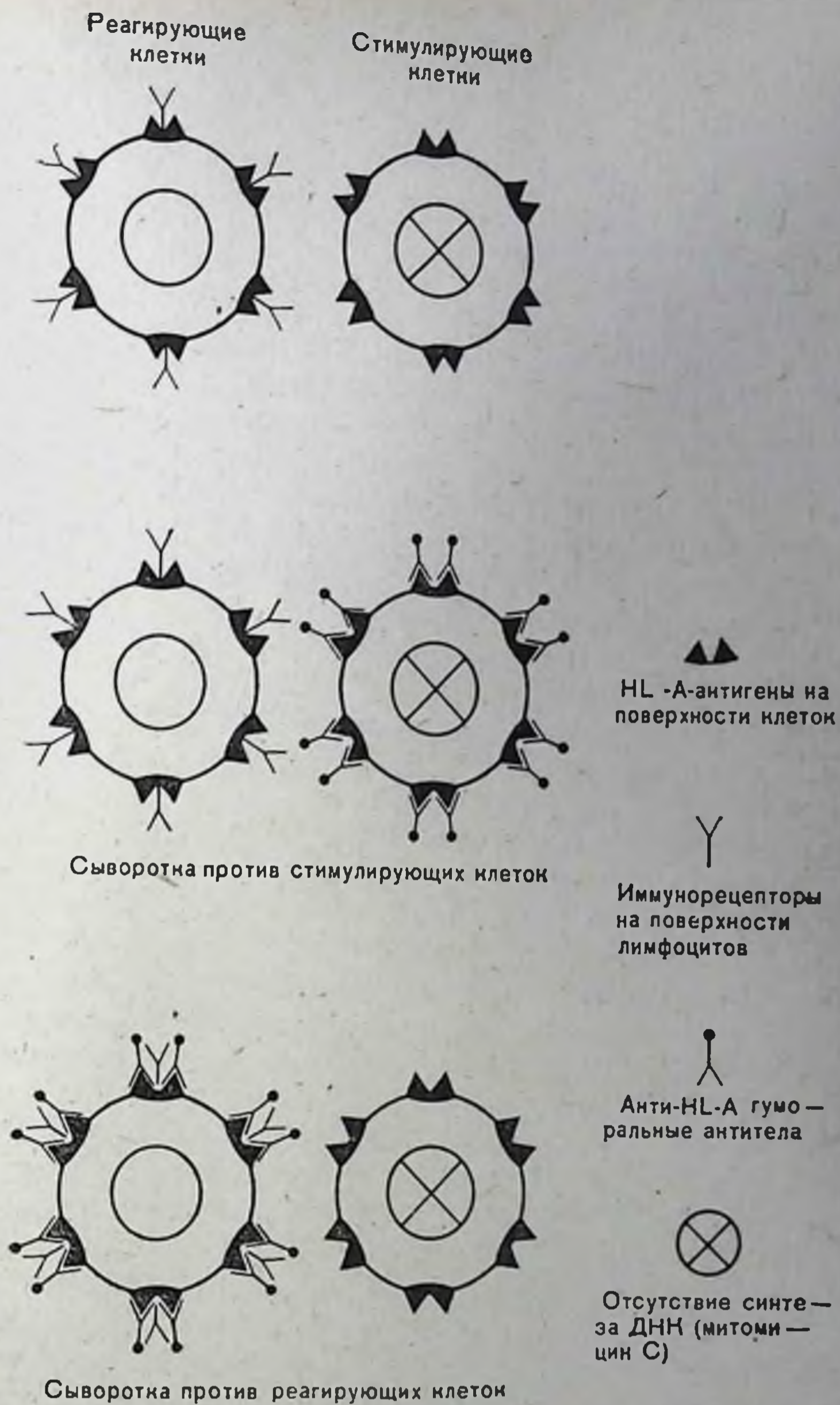


Рис. 7. Два предполагаемых механизма, с помощью которых анти-HL-A-сыворотки блокируют реакцию в СКЛ („Progr. immunol.“, 1971, v. I, p. 1013).

«неуловимым», по выражению Simonsen, рецептором Т-клеток. Мы все еще не знаем точной природы той структуры на поверхности клетки, на которую действуют блокирующие антитела. Антисыворотка, полученная при инъекции клеток из периферической крови, как в наших опытах, или из лимфатических узлов и селезенки, как у Green, может содержать наряду с цитотоксическими анти-Н-антителами аллогенные антитела (не распознаваемые с помощью лимфоцитотоксических тестов), которые направлены против других полиморфных структур клеточной мембраны, различных у донора и реципиента.

Насколько нам известно, способность подавлять активацию лимфоцитов не всегда коррелирует с цитотоксической активностью против антигенов HL-A, хотя данные, полученные в некоторых семьях, позволяют

предполагать, что в этих случаях блокирование все же сцеплено с H-А. Теперь мы подходим к очень важному вопросу, который будет обсужден на сессии 6.

На основании частоты кроссинговера мы знаем, что комплексы H-А и H-2 достаточно велики, настолько велики, что могут включать несколько сотен структурных генов, вероятно, родственных по происхождению и функции. Было идентифицировано по крайней мере 2 гена — MLC у человека и Iг у мышей (они были отделены путем кроссинговера от H-генов: LA и FOUR у человека, D и K у мыши, продукты которых — антигены — были определены при помощи цитотоксических и гемагглютинирующих антител. Напротив, Iг- и MLC-гены распознаются по их специфической функции, а о характере их первичного продукта неизвестно ничего (например, возможно это специфическая пермеаза?). Однако поскольку, согласно результатам опытов, опубликованным Green и нашей группой, эти специфические функции могут блокироваться аллогенными антителами, перед нами остаются две основные возможности:

а) антитела, даже если они не цитотоксичны, реагируют с H-антигенами; следовательно, H-антигены, хотя они контролируются другими генами, необходимы для функционального проявления генов MLC и Iг;

б) антитела реагируют со специфическими продуктами генов MLC и Iг, которые проявляются на клеточной мембране наряду с H-антигенами и другими мембранными компонентами, например «группами крови» (хотя они не распознаются цитотоксическими тестами и необязательно важны для гистосовместимости).

Я признаю, что иногда возможности человека как «подопытного животного» ограничены, и, следовательно, прекрасный опыт Green в некоторых отношениях более показателен, чем наши данные, собранные на материале, взятом от человека. В частности, еще надо отметить, что каждая аллогенная антисыворотка подавляет лишь один из двух специфических иммунных ответов иммуноцитов F_1 , а именно ответ, происходящий от той же родительской линии 2 или 13, против которого выработана антисыворотка. Это исключает возможное объяснение блокады гибелью клеток или неспецифическим нарушением реактивности лимфоцитов, если блокада осуществляется через посредство H-антигенов, так как оба они проявляются на клетках F_1 . Однако мы не знаем, влияет ли аллельное предпочтение на Iг-гены и возможное проявление их специфических продуктов на клеточной поверхности.

Эта важная информация будет вскоре получена в опытах *in vitro*. Нетрудно предсказать, что наиболее интересные результаты будут получены в экспериментах, поставленных по схеме Green, но на мышах. Действительно, Shreffler и соавт. в результате двух последовательных кроссинговеров, уже получили рекомбинантов, различающихся только по Iг-аллелю, тогда как в остальном гаплотип тождествен (т. е. родительские $K^d, Iг^d, D^d$ и $K^k, Iг^k, D^k$ рекомбинантные $K^d, Iг^k, D^{d1}$).

Будет ли аллогенная сыворотка, полученная при инъекции лимфоцитов H-2^{k.k.k} реципиенту H-2^{d.d.d}, блокировать ответ Iг^k-рекомбинанта; для которого сыворотка не цитотоксична? Вероятно, да, если Iг-гены проявляют иммуногенный продукт на клеточной поверхности. Будет ли активна цитотоксическая анти-d сыворотка, полученная у реципиента H-2^{k.k.k}? Вероятно, нет. Удастся ли получить аллогенные антисыворотки, способные блокировать лишь один из иммунных ответов, характерных для данного

¹ Подробно см. в материалах сессии 2.

Ig-гаплотипа? Вероятно, да, при условии, что продукты Ig-генов иммуногенны и Ig-гены расположены в линейной последовательности и между ними возможна рекомбинация.

Это лишь немногие из многочисленных вопросов, которые вскоре будут решены благодаря этим новым экспериментальным подходам. Уже сейчас данные Green и наши наблюдения (если MLC можно приравнять к Ig-гену) позволяют предполагать, что специфические иммунные ответы, по крайней мере ответы с участием Т-клеток, зависят от индивидуальности структур поверхности клетки, которые по своему генетическому контролю имеют отношение к главным системам антигенов гистосовместимости.

Я не могу сейчас гадать о том, можно ли рассматривать эти структуры как (специфические?) иммунорецепторы, сходные по функции с иммуноглобулиновой молекулой на В-клетках, и в какой мере они могут быть подобны иммуноглобулинам или Н-антигенам. По существу, несмотря на все экспериментальные данные, накопленные нами, мы еще не знаем механизма активации MLC.

Green. Я хочу остановиться на двух вопросах, отвечая Serpellini. Прежде всего я не говорил о том, что, если в этой системе пользоваться гетерологичными антителами против Т-клеток, специфичными только для Т-клеток морских свинок, можно полностью снять ответ на все антигены, например, РРD, ДНФ-ГЛ и ГТ. Во-вторых, хочу заявить, что я сознательно был осторожен в отношении того, что именно выявляют эти антитела. Дело в том, что сейчас мы абсорбируем эти антисыворотки клетками гепатомы морской свинки и чистой популяцией клеток лейкоза L₂C, т. е. линией В-клеток. Это позволит нам определить, можем ли мы лишиться сыворотку цитотоксических свойств, не устраняя ее блокирующую активность. Пока это исследование не будет завершено, лучше оставаться осторожным. Однако, возможно, что по существу мы наблюдаем не антитела против гистосовместимости, а антитела против рецепторов.

Serpellini. Я хотел бы добавить один пункт к замечаниям Green, с которыми я полностью согласен. В нашей системе, при абсорбции антисыворотки, полученной путем повторных переливаний от одного и того же донора одному и тому же реципиенту, лимфоцитами с идентичным генотипом HL-A сибсов или донора, мы полностью устраняем способность антисыворотки блокировать лимфоцитарные ответы донора. Абсорбируя эту сыворотку лимфоцитами неродственной особи, фенотипически идентичной донору по четырем антигенам HL-A, мы полностью снимаем цитотоксический эффект, но не можем снять блокирование иммунного ответа.

Председатель Simonsen. Означает ли это, что данный рецептор находится на другой молекуле, не на той, которая несет специфичность HL-A? Вероятно, да.

Bodmer. Мои замечания основываются на возможности, что система Н-антигенов, рецептор Т-клеток и продукт Ig-гена одна и та же. Мы не должны забывать о том, что Н-антигены присутствуют на всех клетках. Следовательно, если придерживаться рассуждения Venasagar и если Н-антигены являются константной областью молекулы, имеющей переменные области, как предполагалось, то константная часть, определяемая при помощи Н-антисывороток, имеется на всех типах клеток. Таким образом, по существу мы не можем поставить знака равенства между Н-антигенами, продуктом Ig-генов и рецептором Т-клеток. То, что мы называем Н-антигеном, должно представлять собой нечто большее, чем постоянная часть, которую мы распознаем серологически.

Председатель Simonsen. Водит прав. Однако я хочу заметить, что рецепторы Т-клеток могут присутствовать и на других типах клеток. Возможно, что особое свойство Т-клеток — это не распознавание как таковое, а реакция, с помощью которой «запускается» в клетке распознавание.

Herzenberg. Я хочу спросить Green: имеются ли данные о том, какое относительное количество клеток поглощает тимидин с тритием в опытах с антигеном PPD или митогеном ФГА? Меня особенно заинтересовал тот факт, что стимуляция PPD значительно подавляется в обоих случаях, хотя это и не относится к стимуляции ФГА.

Green. Мы не проводили автордиографии, чтобы установить количество клеток, включающих ^3H -тимидин. Я хотел подчеркнуть, что у морских свинок линий 2 и 13 ответы на PPD изменялись значительно больше, чем у гибридов F_1 . Вероятно, это объясняется тем, что ответ на PPD, хотя это не было прямо доказано другими способами, также находится под генетическим контролем, сцепленным, скажем, с антигенами гистосовместимости как линии 2, так и линии 13. Таким образом, когда мы вызываем блокаду антисывороткой против линии 2 или 13, у животных линии 2 или 13 мы блокируем все сцепленные с гистосовместимостью Ig-рецепторы инбредного родителя. С другой стороны, у гибридов F_1 после контакта с каждым отдельным видом антител против антигенов гистосовместимости другой рецептор может остаться открытым для ответа на PPD. Возможно, этим объясняется тот факт, что по отдельности H-антитела плохо подавляют ответ у гибридов F_1 . Однако смесь двух антисывороток снижает до изолинии ответ на ДНФ-ГЛ и PPD гибридов F_1 . Таким образом, можно прийти к выводу, что ответ на PPD также находится под генетическим контролем этого типа. С ответом на ФГА дело, по-видимому, обстоит совершенно иначе. Я уже говорил о том, что очистка популяции лимфоцитов снимает реакции на антигены; для такой реакции в популяции лимфоцитов должны присутствовать по крайней мере 1—2% моноцитов, тогда как удаление такого количества моноцитов, какое только технически возможно, все еще оставляет интактным ответ на ФГА. Таким образом, возможно, что ответ на ФГА находится полностью за рамками системы ответов сцепленных с гистосовместимостью.

Herzenberg. Ответ на PPD особенно интересен, так как Green почти полностью подавлял клетки F_1 смесью двух видов антител. Следовательно, было бы особенно интересно установить при помощи автордиографии относительное количество клеток, стимулированных у животных F_1 .

Green. Согласен. Этот опыт безусловно стоит поставить.

Wagner. Я хотел бы вернуться к первому объяснению Вепасеггаф и спросить, допускает ли он, что существует особый иммуноглобулиновый компонент, отличающийся от известных иммуноглобулинов и не проявляющийся в В-клетках, как, например, ген варибельной области, отличающийся от V_L , V_H , V_N , но способный вступать в перекрестную антигенную реакцию с другими антителами против варибельной области. Не следует ли допустить такую возможность и не пытаться любой ценой найти классический иммуноглобулин.

Wepassegaf. Можно ответить Wagner только теоретически, т. е. исходя из логики, так как фактических данных нет. По существу Wagner спрашивает, могут ли Т-клетки иметь иной набор специфичности, чем В-клетки. Конечно, это весьма возможно. Кроме того, я хотел бы пояснить, что пока на этой сессии не было сказано ничего, что «обрекало» бы гены иммунного ответа на клональное проявление.

Raff. Я хотел бы задать вопрос Wepassegaf. Им не было указано, проверял ли он способность тимусных клеток связывать упомянутые им антигены?

Benacerraf. Мы занимались этим вопросом и пока еще не готовы высказаться. Можем лишь заметить, что вопрос представляется интересным.

Raff. Benacerraf не упоминал, в частности, что эти антигены, возможно, придают толерантность Т-клеткам у неответающих животных. Если учесть недавние наблюдения Gerhson, то, пожалуй, нельзя отрицать эту возможность.

Benacerraf. Raff имеет в виду данные, недавно опубликованные Gerhson («Feder, Proc.», 1972, v. 31, p. 778), которые, по-видимому, доказывают, что клетки от неответающих животных дают слабый ответ на ГАТ₁₀, который отсутствует при вторичной стимуляции, тогда как Т-клетки отвечающих животных дают как первичный, так и вторичный ответ, что обнаружено по определению включенного ³Н-уридина. Я должен сказать, что присутствовал, когда Gerhson выступил со своим докладом, и познакомился с его данными. Меня не убедили эти данные. Поэтому я пока еще не считаю нужным объяснять их. На мой взгляд, пока нет убедительных доказательств того, что отсутствие ответа на ГАТ₁₀ обусловлено возникновением толерантности.

Председатель Simonsen. Критическое замечание Benacerraf очень важно, поэтому я хотел бы, чтобы Raff ему ответил.

Raff. Дело в том, что Gerhson пользовался системой переноса тимусных клеток летально облученным сингенным реципиентам, которым затем вводится антиген. Пролиферативный ответ адоптивно перенесенных тимусных клеток определяется по включению уридина, меченного радиоактивным тритием. Gerhson установил, что тимусные клетки как отвечающих, так и неответающих животных пролиферируют в ответ на ГАТ, но тимусные клетки неответающих животных не реагируют на повторные введения ГАТ, тогда как тимусные клетки отвечающих животных реагируют. Более того, если он вначале вводил мышам ГАТ перед забором их тимусных клеток и переносом, то клетки нереагирующих животных не пролиферировали у реципиента при «провокации» ГАТ, тогда как клетки реагирующих животных пролиферировали. Gerhson сделал вывод из этих данных, что тимусные клетки неответающих животных могут распознавать ГАТ, но легко приобретают толерантность. Я признаю, что эти опыты носят предварительный характер, но мне казалось бы неразумным сейчас исключать возможность, что клетки нереагирующих животных способны «распознавать» антиген.

Benacerraf. Я считаю, что против опытов Gerhson можно выдвинуть несколько возражений: 1) различия были не слишком впечатляющими; 2) результаты различных опытов варьировали; 3) опыты не были проконтролированы с помощью неиммуногенных молекул. Я допускаю, что ГАТ₁₀ может вызывать неспецифическую стимуляцию синтеза нуклеиновых кислот по неиммунологическим причинам у неиммунизированных как отвечающих, так и неответающих животных.

Wilson. Я предполагаю, что у Grumet есть данные по этому вопросу и хотел бы, чтобы он выступил.

Grumet. Действительно, мы располагаем некоторыми предварительными данными в отношении понятия толерантности у неответающих животных. В системе такого типа, как показано на рис. 8, где применяется только водный раствор антигена без адьюванта, после первичного введения антигена как отвечающие, так и неответающие животные дают одинаковый ответ IgM на (Т, Г)-А-Л. Хотя у каждой линии наблюдается первичный ответ, только отвечающее животное переключается на ответ IgG после вторичной или третичной антигенной стимуляции. С другой стороны, неответающие животные по существу не реагируют на последующий антигенный

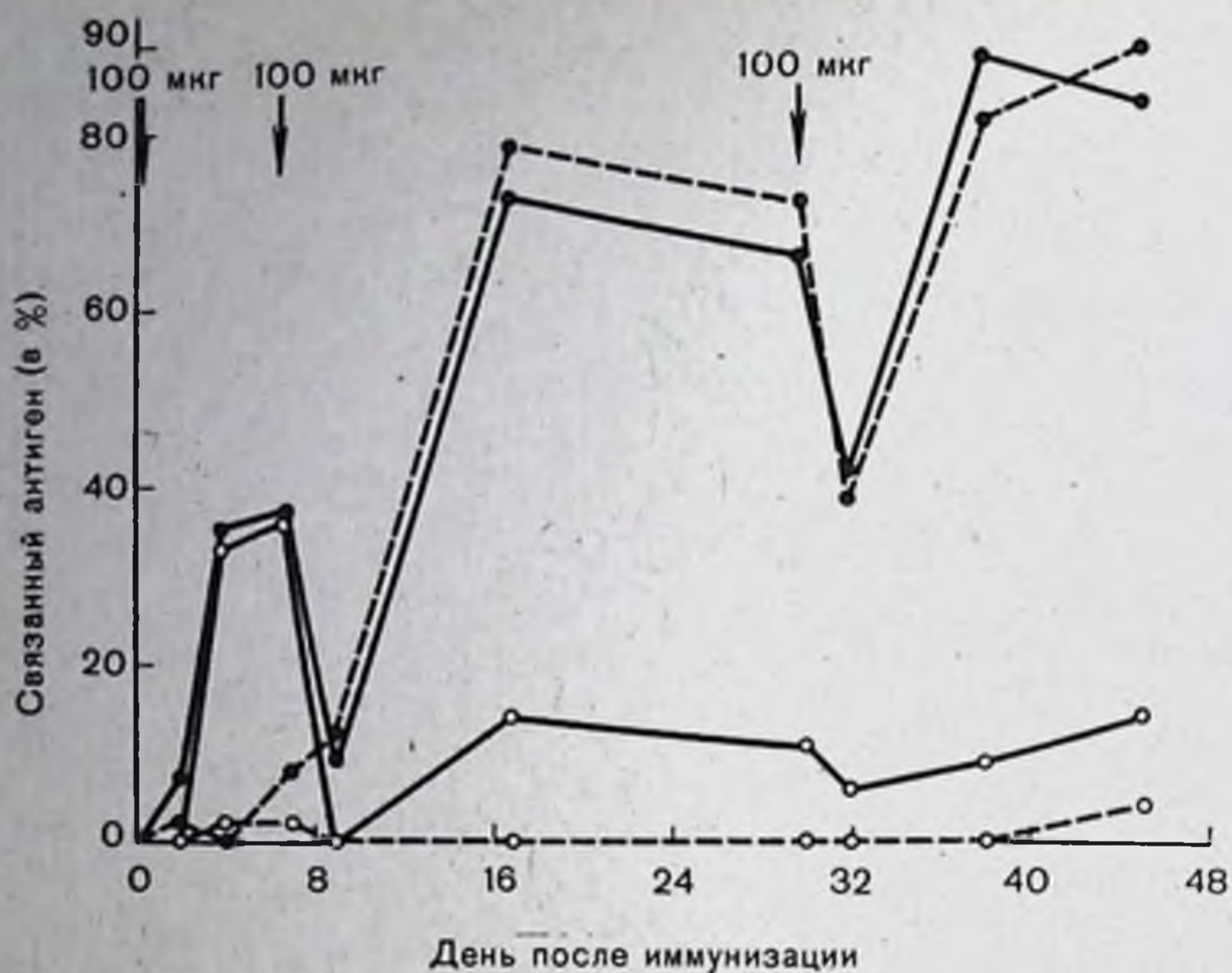


Рис. 8. Синтез антител отвечающими и неответающими мышами после множественной иммунизации (Т, Г)-А-Л. Общий (прямая линия) и резистентный к меркаптоэтанолу (пунктир) синтез антител реагирующих СЗНСВ (черные кружки) и нереагирующих СЗН (светлые кружки) мышей на первичную («нулевой» день), вторичную (7-й день) и третичную (30-й день) иммунизацию (Т, Г)-А-Л (100 мкг). Каждая точка — содержание антител в плазме, собранной от 5 мышей (,App. N. Y. Acad. Sci.', 1971, v. 190, p. 170).

стимул, и наблюдается лишь очень кратковременное падение титра антител (вероятно, вследствие образования комплекса антител с небольшим количеством введенного антигена). Все антитела против (Т, Г)-А-Л у неответающих животных относятся к классу IgM и остаются стабильными по крайней мере в течение месяца после иммунизации. Нового пика ответа нет и нет переключения на образование антител IgG после вторичной или третичной стимуляции антигеном. Клетки селезенки и лимфатических узлов от одного из этих неответающих животных были перенесены облученному сингенному реципиенту и затем этому животному ввели (Т, Г)-А-Л. Перенесенные клетки, которые прежде были не реактивными, вызвали новую вспышку образования антител IgM, так же как у своего первоначального хозяина при первом антигенном стимуле. Плазма от первоначально ареактивных иммунизированных неответающих животных была также перенесена интактным необлученным сингенным реципиентам, одновременно «провокацией» антигеном. Эти реципиенты плазмы не вырабатывали антител против (Т, Г)-А-Л ни при первом, ни при последующих введениях антигена. Таким образом, в плазме ареактивных «неответающих» животных, существует фактор, способный подавлять ответ антител IgM на (Т, Г)-А-Л. В отсутствие Т-клеток, В-клетки как отвечающих, так и неответающих животных одинаково способны вырабатывать антитела IgM в ответ на стимуляцию антигеном (Т, Г)-А-Л¹. Тимэктомия не влияет на синтез антител неответающими животными на (Т, Г)-А-Л, следовательно, у неответающего животного, по-видимому, нет Т-клеток, способных распознавать этот антиген. Скорее правильно это предположение, а не «легкое» приобретение толерантности

¹ Данные, подтверждающие это положение, приведены в дальнейших выступлениях Смит и изображены на рис. 11 и 12. — Прим. ред.

Т-клетками под действием антигена. Опосредованное плазмой подавление реакции у неответающих животных, описанное мной, следовательно, может послужить моделью «толерантности», не зависящей от Т-клеток, которая может существовать вместо модели толерантности Т-клеток, предложенной Gershon, или дополнить ее.

Benacerraf. Я совершенно согласен с высказыванием Grumet, если он хочет сказать, что толерантность В-клеток легко индуцировать у неответающих животных избытком антигена в отсутствие стимулированных Т-клеток. Действительно, Katz и я получили аналогичные данные, пользуясь ДНФ-Д-ГЛ- тимуснезависимым антигеном. Мы легко вызывали толерантность В-клеток, специфическую к детерминанте ДНФ. Однако я хочу отметить, что Raff в связи с опытом Gershon ставит вопрос о так называемом существовании тонкой чувствительности к толерантности Т-клеток у неответающих животных. Я полагаю, что этот вопрос имеет совершенно иной характер и на основании представленных до настоящего времени данных не верю в эту теорию.

Председатель Simonsen. Теперь мы слушаем Shearer по вопросу о проявлении Ig-генов в В-клетках.

Shearer. Я хочу подытожить совместные наблюдения Edna Mozes, Sela и соавт., а также более новые данные, полученные Lichtenberg. Эти исследования были проведены, чтобы установить, можно ли обнаружить проявление Ig-генов на клеточном уровне в клетках костномозгового происхождения и (или) в соответствующих клетках тимусного происхождения. Нам пришлось воспользоваться методом лимитирующих разведений для титрования клеток и переносом иммунокомпетентных клеток сингенным облученным реципиентам. Таким образом, нам удалось избежать сложной трактовки данных у животных, у которых введенные клетки и реципиент различаются по H-2. Мы применяли в качестве иммуногенов синтетические полипептиды, построенные на многоцепочечном поли-L-пролине и многоцепочечном поли-D-аланине, а именно: (Т, Г)-Про--Л, (Ф; Г)-Про--Л, (Ф, Г)-А--Л и (Т, Г)-А--Л. Метод лимитирующих разведений заключается в инъекции дозированных и лимитированных количеств селезеночных клеток или смеси костномозговых клеток и тимоцитов облученным реципиентам. Спустя 14 дней на пике синтеза антител сыворотки облученных реципиентов в индивидуальном порядке титруют на гемагглютинирующую активность. Данные вычисляют как процент животных с заметным уровнем антител (выше ответа у облученных контрольных животных) и записывают в виде функции от количества введенных клеток на графике. Данные, полученные при разведениях селезеночных клеток, были опубликованы. Пока достаточно сказать, что эти опыты с лимитирующими разведениями селезеночных клеток подтвердили наблюдения, сделанные первоначально у интактных мышей с помощью этих иммуногенов. На мой взгляд, это означает существование прямой корреляции между потенцией к иммунному ответу хозяином, контролируемой данными генетическими системами и количеством стимулируемых антигеном единиц ответа, которые могут быть обнаружены с помощью данной методики.

Селезенки мышей содержат как клетки тимусного, так и клетки костномозгового происхождения. Поэтому, пользуясь взвесями селезеночных клеток, невозможно установить, находится ли генетический дефект в Т-клетках, В-клетках или в тех и других. В связи с этим мы провели более сложные опыты с лимитированными разведениями тимусных и костномозговых клеток. Перенос производили двумя путями. Опыты с разведением костномозговых клеток проводили с помощью дозированных и ограниченных ино-

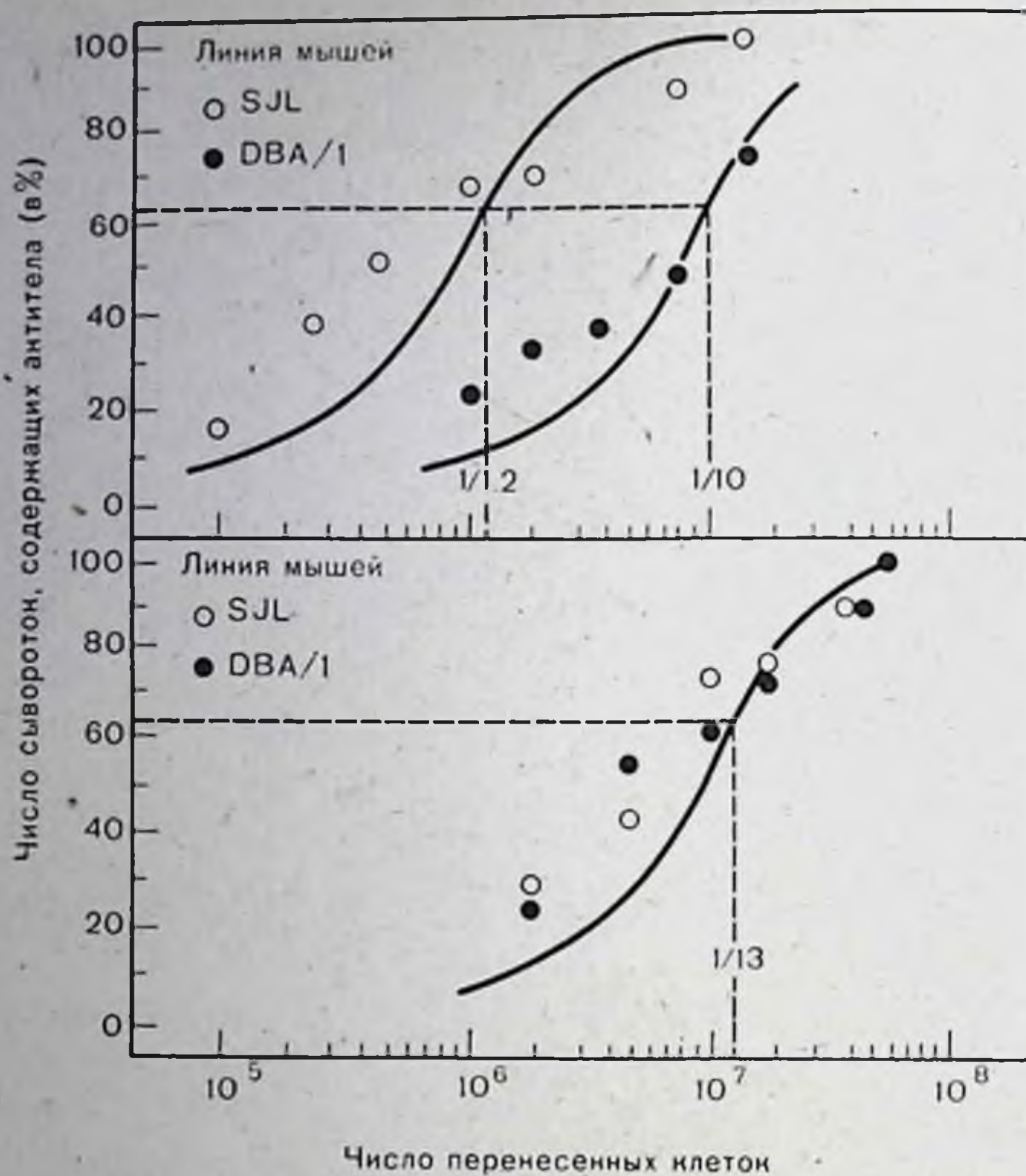


Рис. 9. Эффект введения дозированного и лимитированного числа клеток костного мозга и тимуса на синтез антител к (Т, Г)-Про-Л. Число сывороток, реагирующих с (Т, Г)-Про-Л (в процентах) у мышей-реципиентов SJL (светлые кружки) и DBA/1 (черные кружки) после облучения и инъекции (Т, Г)-Про-Л. Вверху — введение сингенному реципиенту 10^8 тимоцитов и дозированного количества клеток костного мозга, внизу — введение 2×10^7 клеток костного мозга и дозированного количества тимоцитов ("J. exp. Med.", 1972, v. 135, p. 1009).

куляций костномозговых клеток и избыточного не лимитированного количества тимусных клеток. Опыты же с разведением тимусных клеток ставили путем переноса дозированных и лимитированных количеств тимоцитов с нелимитированным и постоянным количеством сингенных костномозговых клеток.

В основном для этой работы использовались линии мышей SJL и DBA/1. Изучали их ответ на (Ф, Г)-Про-Л. Этот антиген состоит из двух иммуногенных областей. Как показали Mozes, McDevitt, Jatou и Sela, линия SJL является высокоотвечающей на часть Про-Л молекулы этого антигена, тогда как линия DBA/1 слабо отвечает на Про-Л. Напротив, мыши DBA/1 отвечает на Ф, Г сильно, а мыши SJL — слабо. Замечу попутно, что ответ на Ф, Г контролируется Iг-1 геном и сцеплен H-2, но иммунный ответ на часть Про-Л этого иммуногена контролируется Iг-3 и не сцеплен с H-2.

Опыты с лимитированными разведениями тимусных и костномозговых клеток показывают, что у линии SJL для детерминанты Про-Л существует в 5 раз большее количество костномозговых клеток-предшественников, чем для детерминанты Ф, Г. Это соответствует тому факту, что мыши SJL слабо отвечают на Ф, Г, но сильно — на Про-Л. Когда лимитированным фактором было количество тимоцитов, различия в количестве клеток-предшественников к Про-Л и Ф, Г не было обнаружено, хотя мыши SJL слабо отвечают на Ф, Г.

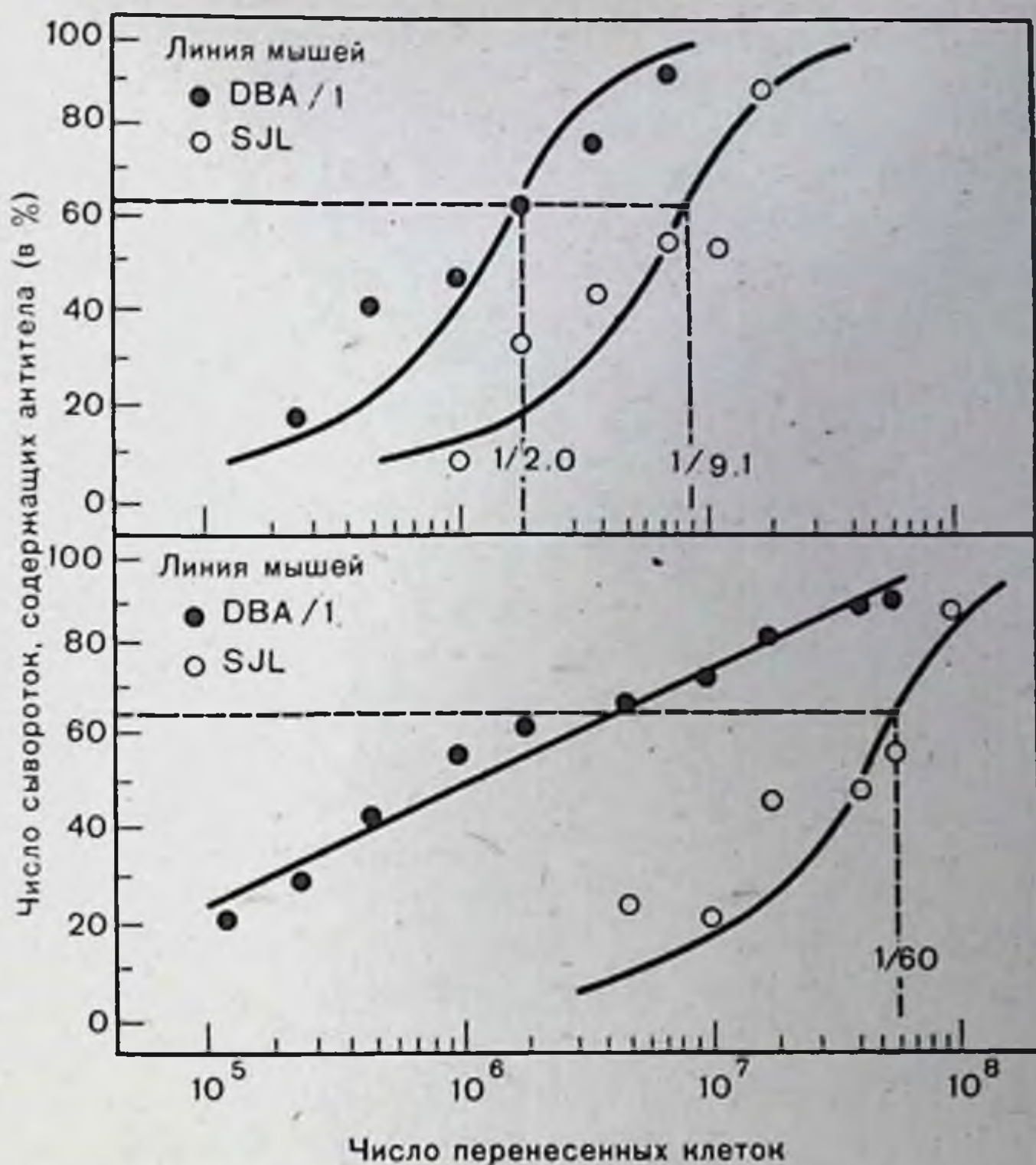


Рис. 10. Эффект введения дозированного и лимитированного числа клеток костного мозга или тимуса на синтез антител к (Ф, Г)-А--Л. Число сывороток, реагирующих с (Ф, Г)-А--Л (в процентах) у мышей-реципиентов SJL (светлые кружки) и ДВА/1 (черные кружки) после облучения и инъекции (Ф, Г)-А--Л. Вверху: введение сингенному реципиенту 10^8 тимоцитов и дозированного количества клеток костного мозга, внизу — введение 2×10^7 клеток костного мозга и дозированного количества тимоцитов („J. exp. Med.“, 1972, v. 35, p. 1009).

У линии ДВА/1 при использовании разведений костного мозга наблюдалась обратная картина, а именно: число костномозговых клеток-предшественников для детерминанты Ф, Г, вызывающей сильный ответ, было в 5 раз больше, чем для специфичности Про- -Л (слабый ответ).

Опять-таки у линии ДВА/1 кривые разведения тимоцитов были одинаковы для специфических ответов на Ф, Г и Про- -Л. Эти данные означают, что генетический дефект иммунного ответа на части Ф, Г и Про- -Л этой иммуногенной макромолекулы на клеточном уровне влияет не на количество тимоцитов, а на количество В-клеток, необходимых для заметного ответа. Можно возразить, что (Ф, Г)-Про- -Л— это сложный иммуноген в том смысле, что он содержит две иммуногенные детерминанты. Поэтому вместо (Ф, Г)-Про- -Л, мы стали использовать (Т, Г)-Про- -Л, ответ на который направлен главным образом против части Про- -Л, и (Ф, Г)-А- -Л, иммунный ответ на который у этих двух линий мышей направлен главным образом против части Ф, Г.

Результаты опытов с лимитированными разведениями тимусных и костномозговых клеток для (Т, Г)-Про- -Л приведены на рис. 9. У сильно отвечающей линии SJL в костном мозге было обнаружено в 8 раз большее число клеток-предшественников, чем у слабо отвечающей линии ДВА/1 (рис. 9, верхняя часть). Напротив, между двумя линиями не найдено различий, если фактором, лимитирующим иммунный ответ было количест-

во введенных тимоцитов (рис. 9, внизу). Таким образом, пользуясь семейством иммуногенов, построенных на многоцепочечном поли-L-пролине, мы не нашли какой-либо разницы при использовании разведений тимусных клеток независимо от того, изучался ли ген Ig-1 или Ig-3.

Далее мы перешли к иммуногену (Ф, Г)-А- -Л и снова получили те же результаты с разведениями клеток костного мозга, что и прежде. В этом случае ответ линии DBA/1 был сильным, а линии SJL — слабым. Была обнаружена заметная разница в количестве клеток-предшественников костного мозга (рис. 10, вверху). Однако в отличие от результатов, полученных при использовании серии иммуногенов на основе Про- -Л, мы нашли заметную разницу по разведениям тимоцитов между животными с сильным и слабым ответом на (Ф, Г)-А- -Л. Так, опыты с разведением тимоцитов показали у мышей DBA/1 не только более высокую частоту ответов по сравнению со слабо отвечающими мышами SJL, но к тому же разведения тимоцитов с сильным ответом животных не соответствовали распределению Пуассона (рис. 10, внизу). Это позволяет предполагать, что в популяции Т-клеток у мышей SJL имеется дефект в отношении ответа на (Ф, Г)-А- -Л. Кроме того, популяция тимоцитов от мышей DBA/1, по-видимому, не только отличается количественно от таковой у SJL, но к тому же Т-клетки сильно и слабо отвечающих животных могут различаться и качественно, поскольку разведения тимоцитов DBA/1 не соответствовали распределению Пуассона. Я особенно хочу отметить, что при специфическом ответе на Ф, Г у мышей SJL, получавших (Ф, Г)-Про- -Л, не было «рисунка разведения», который отражал бы изменения в количестве тимоцитов. Но при реакции на Ф, Г на основе А- -Л тимоциты от той же линии слабо реагирующих животных обнаруживали явный дефект в системе Т-клеток. Иными словами, химическая структура иммуногенной макромолекулы очень важна согласно результатам, полученным данным методом, в определении того проявится ли ген Ig-1 на тимоцитах.

Следовательно, на мой взгляд, а priori невозможно предсказать, будет ли данный генетический дефект обнаружен на уровне тимоцитов. Позднее мы пользовались антигеном (Т, Г)-А- -Л, так как именно при его помощи получена большая часть генетической информации на мышах. Мы изучали с этим иммуногеном три линии мышей: C57BL/6 — сильно отвечающую линию, C3H/HeJ — слабо отвечающую линию и SJL — также слабо отвечающую линию. Кривые лимитирующих разведений еще не полны, но, по-видимому, они соответствуют следующей модели; для лимитирующих разведений клеток костного мозга наблюдался тот же результат, что и во всех предыдущих случаях (табл. 17). Частота костномозговых клеток-предшественников у сильно отвечающих мышей C57BL/6 была больше, чем у слабо отвечающих C3H/HeJ, которая в свою очередь была больше, чем у слабо отвечающих мышей SJL. Важно отметить, что кривая разведения клеток костного мозга линии SJL иногда не превышала 36% уровня положительного ответа.

В опыте с разведениями тимоцитов, показанном в табл. 18, кривая сильно реагирующих мышей C57BL/6 не следовала распределению Пуассона, как и кривая, полученная с тимоцитами сильно отвечающих мышей DBA/1 при ответе на (Ф, Г)-А- -Л. Кроме того, мы установили, что разведение тимоцитов мышей C3H/HeJ следовало точно такой же кривой, хотя эта линия характеризуется слабым ответом. Напротив, положительный ответ слабо отвечающей линии SJL не превысил 36%. Таким образом, проявление генов иммунного ответа на клеточном уровне варьирует не только в зависимости от химического состава иммуногена. Генетика мыши также влияет

ТАБЛИЦА 17

Участие клеток костного мозга в иммунном ответе на (Т, Г)-А- -Л
в зависимости от генетической конституции линии мышей

Количество трансплантированных клеток		% мышей-реципиентов, давших положительный ответ		
тимус ($\times 10^6$)	костный мозг ($\times 10^6$)	C57BL/6 (сильно отвечающие)	C3H/HeJ (слабо отвечающие)	SJL/J (слабо отвечающие)
100	0,5	28	—	14
100	2	50	22	36
100	4	81	42	27
100	8	90	43	36
100	20	100	67	36

ТАБЛИЦА 18

Участие клеток тимуса в иммунном ответе на (Т, Г)-А- -Л в зависимости от генетической конституции линий мышей

Количество трансплантированных клеток		% мышей-реципиентов, давших положительный ответ		
тимус ($\times 10^6$)	костный мозг ($\times 10^6$)	C57BL/C (сильно отвечающие)	C3H/HeJ (слабо отвечающие)	SJL/J (слабо отвечающие)
0,25	20	53	—	16
2,5	20	60	56	14
5	20	62	67	0
10	20	67	64	15
20	20	86	—	14
100	20	100	67	36
200	20	—	—	36

на него, даже если рассматриваются две линии мышей, которые в норме, видимо, реагируют слабо.

Теперь вернемся к некоторым данным, опубликованным около 3 лет назад McDevitt и Chinitz. В табл. 19 я привожу некоторые выдержки из их таблицы, где они сравнивали линии, несущие гаплотипы H-2^b, H-2^k и H-2^s

ТАБЛИЦА 19

Ответ антител на синтетические полипептиды, построенные на поли-D-L-Ала- -поли-Лиз у мышей с различными H-2 гаплотипами

Линия мышей	Гаплотип H-2	% связывания антигена		
		(Т, Г)-А- -Л	(Н, Г)-А- -Л	(Ф, Г)-А- -Л
C57BL/6	b	42	—	—
C3H·SW	b	79	5	73
AKR	k	—	70	73
C3H/HeJ	k	17	71	74
SJL/J	s	5	5	13
A.SW	s	0	0	15

комплекса H-2 в отношении ответа к (Т, Г)-А-Л, (Н, Г)-А-Л, (Ф, Г)-А-Л. Я хочу привлечь ваше внимание к тому, что мыши С57BL/6 с сильным ответом на (Т, Г)-А-Л слабо отвечают на (Н, Г)-А-Л. Напротив, мыши С3Н/HeJ слабо отвечают на (Т, Г)-А-Л, но сильно отвечают на (Н, Г)-А-Л и на (Ф, Г)-А-Л. В этих опубликованных данных самое интересное состоит в том, что мыши SJL не отвечают на эти три полипептида. Действительно, данные, полученные недавно Mozes, показали, что мыши SJL не отвечают даже на полипептид-лизоцим на основе А-Л.

Ввиду этих особых типов ответа интактных мышей SJL и на основе кривых разведения тимоцитов этих мышей можно предположить, что для данной серии полипептидов, построенных на основе А-Л, линия SJL, возможно, является единственной по настоящему неотвечающей линией из всех изученных нами. Я не хочу пока заниматься вопросом о том, какую часть молекулы этих полипептидов можно назвать гаптенем, а какую носителем. Однако, если взять за основу систему ПЛЛ, а возможно, что это действительно важно, я предлагаю применять А-Л и Про-Л и присоединять к аминоконцу боковых цепочек такой гаптен, как ДНФ. Было бы интересно, что покажут опыты с лимитированными разведениями в отношении иммунного ответа на гаптен, соединенный с такими носителями. Я полагаю, что ген ПЛЛ у морских свинок может быть эквивалентом или аналогом гена, контролирующего ответы на А-Л кополимеры у мышей SJL.

Председатель Simonsen. Хочет ли McDevitt высказаться по этому поводу?

McDevitt. Мне кажется, что мы несколько по-разному подходим к некоторым моментам. Вернемся к некоторым данным, изложенным Shearer. SJL — это не единственная линия мышей, которая слабо реагирует на (Т, Г)-А-Л, (Н, Г)-А-Л и (Ф, Г)-А-Л. Линия ASW также слабо реагирует на все три антигена. Таким образом, дело не в линии как таковой, а скорее в функции аллеля H-2s. Кроме того, мне не ясны различия в результатах опытов с лимитированными разведениями, полученные с антигенами (Т, Г)-А-Л на мышях С57 и С3Н, а также с антигенами (Ф, Г)-А-Л на мышях DBA/1 и SJL. Мыши SJL имеют множество генетических отличий от линий С57 и С3Н, и, мне кажется, надо четко решить, хотим ли мы изучать генетические различия, связанные с H-2, или другие генетические различия. С моей точки зрения, те скрещивания, которые хочет проверить Shearer, избраны неверно. Если мы хотим изучать H-сцепленные гены иммунного ответа, то я предложил бы ему пользоваться такими конгенными линиями, как С57 В1/10 и В10. ВР или С3Н и С3Н. SW, иными словами, линиями, которые различаются только по комплексу H-2, а следовательно, и по генам Iг. Различия в результатах, полученные Shearer в разных комбинациях линий, вполне возможно объясняются другими генами, контролирующими количество тимусных клеток или темпы пролиферации, или еще какими-то факторами, очень мало известными нам. Для того чтобы проводить опыты с лимитированными разведениями, так, чтобы получить четкий ответ о том, какой тип клеток лимитирует ответ (если даже допустить, что этот метод вполне достоверен, в чем я пока не вполне убежден), необходимо пользоваться конгенными линиями, различающимися только по комплексу H-2. Если использовать линии, имеющие совершенно различные генотипы, то вполне возможны генетические эффекты, не имеющие ничего общего с генами иммунного ответа, сцепленными с H-2.

Shearer. Я принимаю замечания McDevitt. Сейчас ведутся опыты, в которых будут также использованы мыши С3Н. SW. Если SJL действительно является такой особой линией, то, возможно, нам следует пользоваться

линией мышей гаплотипа H-2^P, которые применял Вепасеггаф в системе ГАТ. Мыши H-2^P, видимо, также слабо реагируют на серию полипептидов А--Л.

Вепасеггаф. Если мы обратим свое внимание на тесты с лимитированными разведениями, то можно заключить, что у Shearer наблюдались в основном 3 типа отсутствия ответа: первичный дефект В-клеток без дефекта Т-клеток; выраженный дефект Т-клеток и, наконец, промежуточный тип.

Shearer. Первый из этих типов обнаружен нами с помощью Про--Л иммуногенов, которые дают распределение Пуассона и частоту $1-2 \times 10^{-7}$. Два других типа наблюдаются при применении А--Л иммуногенов. У мышей SJL мы получили только около 36% ответов; у мышей C57BL/6 и СЗН/НЈ тимоциты дали плоские кривые разведения.

Вепасеггаф. Я хочу подчеркнуть, что линии, которые дали эти типы ответов, описанные Shearer, крайне интересны и заслуживают дальнейшего изучения.

Herzenberg. Я согласен с замечаниями Вепасеггаф и хочу его дополнить. Думал ли Shearer о том, чтобы приготовить смеси тимусных клеток и установить, объясняются ли наблюдаемые феномены одним типом клеток или взаимодействием двух типов клеток? Возможно, не все участники нашего совещания знают, что у гибридов мышей SJL можно получить супрессию В-клеток Т-клетками. Согласно предварительным данным, существуют два типа Т-клеток, один из которых кооперирует в некоторых иммунных ответах, а другой подавляет их, особенно в аллотипических системах. Быть может, некоторые из этих феноменов проявляются в кривых Shearer.

Shearer. Имеет ли в виду Herzenberg кривые SJL или плоские кривые?

Herzenberg. Обе кривые. Плоская кривая может отражать двухклеточную систему, где один вид клеток подавляет, а другой усиливает тот ответ, который мы наблюдаем у мышей SJL. Shearer не получал почти никакого ответа при добавлении Т-клеток. Это может также объясниться тем, что преобладающий тип клеток является супрессорным, а не активирующим.

Shearer. Я не могу возражать против предположения Herzenberg, хотя, возможно, этот феномен объясняется в некоторой степени независимостью от тимуса и/или неспецифическими растворимыми факторами, выделяемыми тимоцитами. При этом иммунный ответ не обязательно должен зависеть точно от количества введенных тимусных клеток. Я полагаю в отношении кривой мышей SJL, что здесь имеется дефект и Т- и В-клеток. Когда мы думаем, что берем избыточное неограниченное количество костномозговых клеток, то, вероятно, это допущение по существу неверное. Собственно говоря, не представляется возможным получить ответ свыше 30 или 40%. То же самое можно сказать и о разведениях В-клеток: дефект тимоцитов у мышей SJL настолько силен, что, возможно, простым увеличением количества введенных тимоцитов нельзя достигнуть таких условий, в которых этот ответ лимитируется только количеством введенных костномозговых клеток. Наконец, я хочу добавить, что многие опыты с переносом, особенно с антигенами (Ф, Г)-Про--Л и (Ф, Г)-А--Л, проводились с аллогенными клеточными смесями, а именно: клетки SJL и DBA/1 вводили тому или другому облученному реципиенту — родительской линии. В системе этого рода легко дать ошибочную трактовку данных, так как, если получить низкий ответ для данного сочетания клеток слабо и сильно отвечающих животных, то мы не можем установить, объясняется ли этот низкий ответ генетическим феноменом или неэффективным взаимодействием клеток из-за несовместимости по H-2. Однако при использовании антигена (Ф, Г)-Про--Л, состоящего из двух иммуногенных детерминант, мы можем контролировать этот фактор в своих опытах. Так, если мы иммунизируем (Ф, Г)-

Про-Л и определяем ответ на Ф, Г и на Про-Л, то мы всегда имеем «внутренний» контроль для проверки эффективности клеточного взаимодействия. Именно такие комбинации мы применяем при аллогенном переносе. В заключение следует сказать, что они подтверждают результаты, полученные нами с сингенными клеточными смесями.

Warner. Я хотел бы сделать три замечания, поддерживающие слова McDevitt о том, как важно пользоваться, конгенными линиями. Первое мое замечание в отношении слабого ответа заключается в том, что линия SJL характеризуется повышенной частотой злокачественных образований. Таким образом, у мышей, возможно, существует «предзлокачественное» состояние, которое может проявляться в наличии популяции клеток, лишенных иммунокомпетентности. McDevitt упоминал, что у мышей A. SW *in vivo* наблюдается тот же ответ, что и у SJL. Это, казалось бы, противоречит предложенным объяснениям, но тем не менее я считаю, что важно было бы доказать при помощи теста с лимитирующими разведениями, что ответ у мышей A. SW такой же, как у мышей SJL. Во-вторых, согласно нашим наблюдениям, если сравнить мышей 129/J и C57Bl, то можно установить, что разница в ответе на (Т, Г)-А-Л между ними почти столь же велика, как между мышами C57Bl и CBA, хотя и те и другие называются просто отвечающими линиями. Это, возможно, свидетельствует о том, что существуют другие генетические факторы, которые также контролируют выраженность ответов против (Т, Г)-А-Л. Поэтому необходимо подчеркнуть, что Shearer должен использовать конгенные линии в своих опытах с лимитирующими разведениями. Я уверен, что он убедится, что существуют другие генетические контрольные механизмы, влияющие на темпы образования антител, возможно на уровне аллотипа. Действительно, мыши 129/J и C57Bl несут разные иммуноглобулиновые аллотипы. Третье мое замечание относится к результатам исследования Benasergaf и наших собственных опытов с (Т, Г)-А-Л, а именно: клетки, связывающие антиген, присутствуют в одинаковых количествах в селезенках у неиммунизированных отвечающих и неответающих мышей. Мы обнаружили такое же количество этих клеток в селезенках мышей *pude*, лишенных тимуса, поэтому мы считаем, что большинство этих клеток являются В-клетками. В опытах со связыванием антигенов исследуются периферические В-клетки в селезенке, тогда как данные Shearer, полученные с тем же антигеном, позволяют заключить, что в костном мозге присутствует меньшее количество клеток-предшественников антителообразующих клеток. Поэтому я хотел бы задать вопрос: может ли Shearer согласиться с тем, что фактически имеет место дефект в пролиферации стимулированных антигеном В-клеток, а не снижение количества таких клеток, несущих рецепторы (Т, Г)-А-Л?

Shearer. Я прокомментирую первое и последнее замечание Warner. На его первый вопрос о возможных осложнениях, связанных с использованием мышей SJL, склонных к злокачественным заболеваниям, можно ответить только в опытах с иммуногеном (Ф, Г)-Про-Л, с которым мы фактически получили большинство своих наблюдений. У этих же мышей наблюдали ответы на Ф, Г и Про-Л в одних и тех же антисыворотках и ответ на Про-Л был сильным. Если повышенная частота злокачественных образований как-то связана с ослаблением иммунной системы, то я полагал бы, что специфичность этого ослабления была бы более широкой и не относилась бы только к Ф, Г, тем не менее мы наблюдаем совершенно нормальные сильные ответы на Про-Л. В отношении связывания антигена видимо существуют некоторые расхождения между данными Warner и моими данными. Я хочу отметить, что у интактных мышей при первичном ответе McDevitt,

Sela, Grumet и соавт. не обнаружили существенной разницы между иммунными ответами у сильно и слабо отвечающих животных. Я полагаю, что Wagner в опытах со связыванием антигенов пользовался интактными, а не предварительно иммунизированными животными.

Wagner. Да, это так.

Shearer. Поэтому я не удивляюсь тому, что у нестимулированных животных нет разницы по клеткам, связывающим антигены. Это вполне естественно и соответствует титрам антител, полученных McDevitt, Sela и Grumet при первичном ответе. В опытах по переносу лимитирующих разведений селезеночных клеток, которые, возможно, содержат периферические В-клетки, мы отмечаем разницу первичного ответа в 5—6 раз. Это расхождение я могу объяснить, только предположив, что перенос в лимитирующих разведениях характеризуется по крайней мере не меньшей чувствительностью, чем опыты на интактных мышах.

Braun. Мои замечания основываются на предположении Herzenberg о том, что в опытах Shearer, возможно, участвует два типа клеток: один стимулирующий, другой — подавляющий. На основании имеющихся экспериментальных данных мы можем с полным правом допустить, что существует только один тип Т-клеток, который в зависимости от того, насколько интенсивно он включает регуляторные процессы в антигенреактивных В-клетках, может либо усилить, либо подавить функцию В-клеток. Я хотел бы остановиться на данных, указывающих на такой двухфазный ответ В-клеток, особенно поскольку это предположение может объяснить также полученное Shearer распределение реакций не по закону Пуассона.

Новейшие данные о влиянии аллогенных взаимодействий на функцию В-клеток *in vitro* показывают, что некоторые аллогенные взаимодействия могут только привести к стимуляции В-клеток. Другие же аллогенные взаимодействия в зависимости от количества аллогенных клеток в смеси могут привести либо к усилению, либо к подавлению ответа (Adler, Braun).

Если смешать в системе Mishell—Dutton селезеночные клетки С57 и СВА, то ответы будут усилены независимо от того составляют ли пропорции аллогенных клеток 1:1, 1:2, 3:1 и т. д. Однако если смешать селезеночные клетки СВА и DBA/1 в пропорциях 1:1, 1:2, 2:1 и т. д., то образование антител подавляется. Мы знаем, что избыточная стимуляция цАМФ в В-клетках подавляет их функцию (Braun.—«Proc. Nat. Acad. Sci.», 1971, v. 68, p. 114), тогда как умеренная стимуляция усиливает функцию В-клеток. Поскольку мы знаем также, что реакция СКЛ может повысить уровень цАМФ (Shiotawa, Braun — неопубликованные данные), то, естественно, возник вопрос: может ли взаимодействие СВА и DBA при высоких пропорциях каждого типа клеток подавлять В-клетки вследствие избыточной стимуляции. Если это так, то очевидно, при уменьшении относительного количества клеток СВА и DBA в смешанной культуре клеток селезенки реакция должна быть усилена, а не подавлена. Это предположение оказалось правильным: когда относительное количество клеток DBA было снижено до 2%, образование антител повысилось по сравнению с ответами в чистых культурах СВА. Кстати говоря, добавление стимуляторов к цАМФ, например, поли А:У к культурам, состоящим из 98% клеток СВА и 2% DBA подавляло иммунный ответ. Таким образом, возможно, что при взаимодействии между активированными Т-клетками и антигенореактивными клетками в опытах Shearer наблюдалось как усиление, так и подавление, подобно аллогенному взаимодействию между клетками СВА и DBA в наших опытах. Возможно, этим объясняются отклонения от распределения Пуассона в его тестах с лимитирующими разведениями. В других его системах

ситуация, возможно, была такой же, как в наших опытах С57×СВА, где взаимодействие Т- и В-клеток вело только к усилению ответа. Я хочу сказать, что факторами, контролирующими ответ В-клеток, усиление или подавление их функций, может быть степень взаимодействия мембран или взаимодействия с помощью гуморальных факторов между активированными антигеном Т-клетками и активированными антигеном В-клетками. В некоторых генетических условиях можно получить только усиление, а в других можно наблюдать либо усиление, либо подавление в зависимости от степени стимуляции регуляторной системы в В-клетках (система, которая, как мы полагаем, опосредована АМФ). По существу я предполагаю, что взаимодействия в тех условиях, в которых Shearer получает отклонения от распределения Пуассона, возможно при генотипах, способных к взаимодействию либо усиливающему, либо подавляющему функции В-клеток. С другой стороны, распределение по Пуассону ответов в опытах Shearer возможно относится к тем генотипам, у которых взаимодействие между активированной Т-клеткой и антигеннореактивной В-клеткой, может привести только к усилению функции В-клеток.

Shearer. Я не исключаю этого предположения. Думаю, что это наиболее вероятно в системе Iг-3, где поли А:поли У усиливает ответ слабо отвечающих животных до уровня сильно отвечающих. Поли А:поли У не изменяет каким-либо образом реактивность этих животных в ответе, контролируемом Iг-1.

Braun. Я не имел в виду только эту ситуацию.

Ung. Я хотел бы, чтобы для тех, кто не является специалистом по генетике, несколько пояснили, о чем идет речь. Если я правильно понимаю, то, как Shearer трактует свои данные, существуют Iг-гены H-2-сцепленные, действующие на уровне В-клетки, но не действующие на уровне Т-клетки. Противоположные доводы состоят в том, что он не пользуется конгенными линиями и что поэтому рассматриваются такие гены и их продукты, которые выходят за пределы непосредственно интересующей нас системы. Однако пока еще я не слышал замечаний о том, что Т-клетки животных «неотвечающего H-2-генотипа» могут дать такую же кривую лимитирующих разведений, как клетки отвечающих животных. Мне кажется, что это очень важный момент и те, кто считает, что Iг-1 действует на уровне Т-клеток, должны высказаться в пользу применяемой методики.

Председатель Simonsen. Именно это пытался сделать McDevitt.

McDevitt. Да, действительно, я, во-первых, предполагаю, что кривые лимитирующих разведений могут ввести в заблуждение, так как они одинаковы для Т-клеток, отвечающих и не отвечающих животных, несмотря на данные, приведенные Venesegraf о том, что Iг-гены влияют только на функции Т-клеток. Во-вторых, можно допустить, что эффективность распознавания антигена Т-клетками может быть весьма различной и для создания заметного эффекта требуется большее количество взаимодействий между Т- и В-клетками, а это может создать видимость различного количества предшественников В-клеток.

Venesegraf. Я не хотел бы комментировать здесь методику. Я просто использую ту информацию, которую она дает. Однако я хотел бы остановиться на другом вопросе: поскольку в этой системе так важны мыши SJL и предполагалось, что у этой не отвечающей линии существует дефект в скорости дифференцировки или пролиферации специфических предшественников В-клеток, я хотел бы напомнить, что хотя мыши SJL не дают иммунного ответа на ГАТ₁₀, мы с Mauger смогли вызвать адекватный синтез антител против ГАТ₁₀ у мышей SJL путем иммунизации ГАТ₁₀ в комплексе с метилированным сывороточным альбумином.

Shearer. Отвечая Веласегга, мне хотелось бы сказать, что наблюдаемые нами различия по лимитирующим разведениям В-клеток или костномозговых клеток сами по себе еще не обязательно доказывают, что дефект локализован в самих В-клетках. Все мы знаем или предполагаем, что в иммунологическом процессе одним из поздних этапов является стимуляция В-клеток. Вполне возможно, что фактически дефект возникает на каком-то более раннем этапе, а мы просто видим разницу на уровне В-клеток. Каковы могут быть эти этапы? На мой взгляд, дефект может проявляться либо в самих В-клетках, либо в клеточном взаимодействии. Когда мы пользуемся иммуногенами, производными поли-*L*-пролина, мы не видим различий, зависящих от тимуса. Мы видим различия между разведениями тимоцитов для мышей SJL с иммуногенами, производными поли-*D*, *L*-аланина. На мой взгляд, это в значительной мере доказывает обоснованность применения этой системы. Если бы мы постоянно не находили различий по лимитирующим разведениям тимоцитов, независимо от линии мышей и независимо от иммуногенов, то тогда методика могла бы вызывать сомнения. Мы знаем, что у слабо реагирующих животных нет дефекта по пролиферации Т-клеток под влиянием (Ф, Г)-Про-*L*. Однако это не установлено для иммуногенов производных многоцепочечного поли-*D*, *L*-аланина.

Sela. Теперь, когда подробно изучается генетический контроль иммунного ответа на сложные антигены или на отдельные детерминанты простых антигенов, следует заметить, что антигенная конкуренция может дать эффект, сходный, на первый взгляд, с эффектом генетического контроля. Генетически контролируемая способность отвечать на некоторые «доминантные» антигены молекулы с многими детерминантами может ослабить или усилить ответ на другие детерминанты той же молекулы. Понятно, что в некоторых условиях это может привести к ложным выводам. Например, если бы способность отвечать на детерминанту Ф, Г исследовалась на разных линиях мышей с использованием (Ф, Г)-Про-*L* в качестве единственного иммуногена, то можно было бы установить, что на Ф, Г мыши СЗН/НеJ реагируют слабо, а мыши DBA/1 — сильно. В действительности обе линии способны на сильный ответ на Ф, Г, как можно установить в опытах с использованием в качестве иммуногена (Ф, Г)-А-*L*. Генетические различия, которые действительно существуют между этими линиями, контролируют способность отвечать на Про-*L*, а не на Ф, Г. Очевидно, уровень ответа против Про-*L* влияет на ответ на Ф, Г и подавляет его у мышей СЗН/НеJ, не подавляя у мышей DBA/1. С другой стороны, можно задать вопрос — дает ли мышь СЗН слабый ответ на Ф, Г в иммуногене (Ф, Г)-Про-*L* потому, что она дает сильный ответ на Про-*L*? Это представляется маловероятным.

Cohn. Я не считаю слишком странным, что разница отмечается в популяции В-клеток и отсутствует в популяции Т-клеток, хотя рецептор идентичен у обеих популяций. Я хочу пояснить это, подчеркнув асимметрию в соотношениях между Т- и В-клетками. Допустим, что у нас 100 Т-клеток и 100 В-клеток со специфичностью к (Ф, Г)-Про-*L*. Допустим, что среди сильно отвечающих В-клеток линии DBA/1 имеется 95 клеток против Ф, Г и 5 клеток против Про-*L*. И в популяции Т-клеток имеется такое же соотношение. Если бы я исследовал популяцию В-клеток на каждую специфичность методом лимитирующих разведений, то я нашел бы 95 клеток против Ф, Г и 5 клеток против Про-*L* к антигену (Ф, Г)-Про-*L* в отношении 20:1. Я бы принял это за единицу кооперативной активности Т-клеток.

Если с другой стороны, у меня имеется мышь SJL с 5 Т- и В-клетками против Ф, Г и 95 клетками против Про-*L*, то я нашел бы точно ту же единицу кооперативной активности Т-клеток, но в популяции В-клеток, я

нашел бы 5 клеток против Ф, Г и 95 клеток против Про-Л. Таким образом, из-за этой асимметрии тот факт, что Sheager нашел у двух линий мышей одинаковые уровни Т-клеток и разные уровни В-клеток, означает, что две популяции В-клеток по-разному соотносятся у двух линий, но отношение между Т-клетками может быть разным, а может быть и одинаковым. Полученный результат не исключает различий между Т-клетками, так как эти различия не исследованы.

Sheager. Я хочу внести ясность в один вопрос, связанный с замечанием **Cohn**. Если у нас имеется кривая лимитирующих разведений, где ответы на Ф, Г и Про-Л совпадают у одной линии мышей, то можно обработать эти данные методом χ^2 по таблице 2×2 , чтобы обнаружить ассоциацию ответов на Ф, Г и Про-Л. Иными словами, мы можем задать вопрос — существуют ли две популяции Т-клеток, стимулируемых (Ф, Г)-Про-Л или же действует только одна популяция. Полученные величины при тесте χ^2 составляли от 22 до 45, т. е. были значительно выше пороговой величины, равной 3,8. Иными словами, найдены убедительные статистические доказательства связи ответа на Ф, Г и Про-Л в опытах с лимитирующими разведениями тимусных клеток. Эти статистические данные поддерживают гипотезу, что мы имеем перед собой единую популяцию.

Председатель Simonsen. Думаю, что это решает вопрос о специфичности. Согласен ли **Cohn**?

Cohn. Я этого не понимаю. Я утверждаю, что Т-клетки Ф, Г и Т-клетка Про-Л функционально тождественны в отношении кооперативной активности. Следовательно, тест, предложенный Sheager, не имеет прямого отношения к вопросу.

Sheager. Это одна из причин, почему мы перешли к иммуногенам (Ф, Г)-А-Л и (Т, Г)-Про-Л.

Cohn. Да, но я пытался объяснить, что Sheager мог бы получить такие же уровни тимусных клеток при тесте на кооперативную активность против (Ф, Г)-Про-Л у сильно и слабо отвечающих животных. Вместе с тем две популяции Т-клеток у сильно и слабо отвечающих животных могли бы характеризоваться разными отношениями аллотипических специфичностей к Ф, Г и Про-Л, так же как и у В-клеточных популяций двух линий. И-ген мог проявляться как в В-, так и в Т-клетках, и Sheager не обнаружил бы разницы на уровне Т-клеток. С другой стороны, он нашел бы разницу на уровне В-клеток, так как именно это исследуется в его тесте.

Benacerraf. Я не могу оставить высказывание **Cohn** без ответа. Как следует из его замечаний, **Cohn** считает, что все антигенные детерминанты, которые могут индуцировать образование антител, способны одинаково функционировать в качестве гаптенных и в качестве носителей. Это несомненно неверно. Например, полисахариды и поли-*D*-аминокислоты функционируют как гаптенные детерминанты, но не могут быть детерминантами носителя. Я знаю, что у **Grumet** есть некоторые данные, относящиеся к этому вопросу. Может быть, он также выступит?

Председатель Simonsen. Желает ли **Grumet** выступить?

Grumet. Я хотел бы задать Sheager пару вопросов, о которых мы с ним уже неофициально говорили. В частности, я хотел бы обратиться к использованной им модели (Т, Г)-А-Л. Если взять крайний пример переноса большого количества В-клеток и очень большого количества Т-клеток, то он утверждает, что по проценту отвечающих животных между линиями С57 и С3Н нет разницы. Таким образом, согласно его определению, отсутствует разница между отвечающими и неответающими линиями.

Shearer. Нет, это не совсем так. Кривые разведения говорят о том, что мы ввели большое количество Т-клеток с очень малым количеством В-клеток. Количество тимоцитов на реципиента составляет от 1 до 8 млн. Таким образом, между отвечающими и не отвечающими животными разница есть.

Grumet. Но если ввести животному большое количество В-клеток и максимальное количество Т-клеток, то как у линии СЗН, так и у линии С57 ответ наблюдается у 100% мышей. Следовательно, при большом количестве перенесенных клеток, по словам Shearer, разницы между отвечающими и не отвечающими линиями нет. Я считаю, что трудно примириться с некоторыми из этих данных из-за того определения отвечающих и не отвечающих линий, которым пользуется Shearer.

Sela. Может ли Grumet иначе сформулировать свою мысль? Я просто не понимаю, что он хочет сказать.

Grumet. Если взять целый тимус и костный мозг от мыши С57 и перенести их облученной мыши С57 и если взять целый костный мозг и тимус от мыши СЗН и перенести их облученной мыши СЗН, то при стимуляции этих мышей, согласно указанному определению, обе линии будут отвечающими. Следовательно, когда Shearer рассматривает свои данные с этой точки зрения, то, очевидно, у него нет разницы между мышами СЗН и С57 по ответу на (Т, Г)-А--Л.

Shearer. Да, если ввести большие количества костномозговых и тимусных клеток, но не в диапазоне лимитирующих количеств.

Grumet. Возможно, что Shearer просто взял слишком низкий порог, отделяющий отвечающих мышей от не отвечающих. По-видимому, ему следовало бы взять значительно более высокий титр антител или выяснить иммуноглобулиновый класс гемагглютинирующих антител, чтобы выявить различие между отвечающими и не отвечающими мышами. Из-за этого методического вопроса мне трудно согласовать его данные с некоторыми нашими наблюдениями. Я хотел бы рассказать об этих данных, так как считаю, что между выводами, которые можно сделать из данных Shearer и из наших данных, существуют очень важные противоречия. Очевидно, на основании своих данных Shearer сказал бы, что между Т-клетками нет разницы, следовательно ген Ig-1 проявляется в В-клетках и не проявляется в Т-клетках.

Shearer. Это так в отношении линий СЗН/HeJ и С57В1/6. Grumet отметил также, что при помощи наших методик мы не нашли разницы между линиями СЗН/HeJ и С57В1/6 и, следовательно, методика не достоверна. Кривые для клеток костного мозга совершенно иные. Мы не видим разницы только на кривых для тимоцитов. Как я уже говорил, я еще не считаю, что это доказывает, что дефект должен относиться к В-клеткам. Я вполне согласен на минимум два предположения относительно гена Ig-1 у линий СЗН/HeJ и С57В1/6. Разница может относиться к В-клеткам или же к клеточному взаимодействию. Мне кажется, что мы оба можем согласиться с предположением, что дефект может быть локализован на уровне клеточного взаимодействия.

Grumet. Опыты, поставленные нами с McDevitt и Mitchell, очевидно, привели бы к другому выводу, а именно, что ген Ig-1 проявляется в Т-клетках, а не в В-клетках. Мы пользовались конгенными мышами СЗН и СЗН·SW, различающимися только по Н-2 комплексу. Первая линия является не отвечающей линией гаплотипа Н-2^k, а вторая отвечающей линией гаплотипа Н-2^b. Водный раствор антигена (Т, Г)-А--Л вводился в нулевой день, на седьмой день и вновь на тридцатый день и антитела определялись при помощи модифицированного теста Фагг. Результаты приведены на рис. 8. Эти данные говорят о том, что первичный ответ одинаков у реагирующих и не-

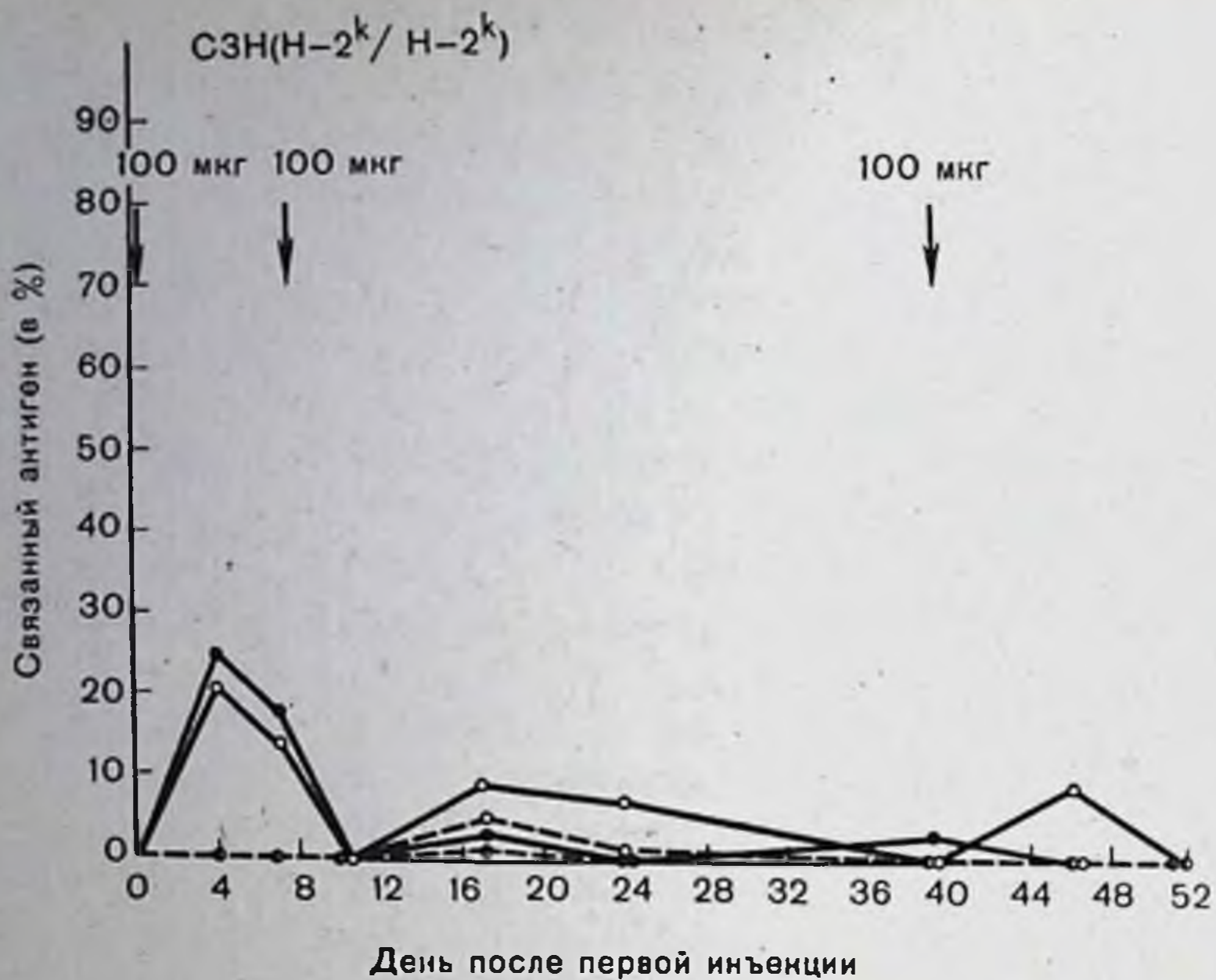


Рис. 11. Эффект тимэктомии на антителообразование к (Т, Г)-А--Л у неответающих животных. Ответ взрослых, тимэктомированных и ложнооперированных неответающих (СЗН) мышей на 100 мкг (Т, Г)-А--Л, введенного внутрибрюшинно на «нулевой», 8-й и 39-й день. Общий пул антител у ложнооперированных животных — сплошная линия и светлые кружки; антитела, резистентные к 2-меркаптоэтанолу у ложнооперированных животных — пунктир и светлые кружочки, общий пул антител у тимэктомированных животных — сплошная линия и темные кружочки, антитела, резистентные к 2-меркаптоэтанолу у тимэктомированных животных — пунктир и черные кружочки ("App. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 190, p. 170.)

реагирующих животных. Перед вторичной антигенной стимуляцией все животные совершенно одинаковы, различия между ними нет. Все антитела обеих линий при первичном ответе состоят из IgM. После вторичной стимуляции отвечающие животные продуцируют типичный вторичный ответ (или ответ типа памяти) со значительно более высоким титром и происходит переключение на IgG. Неответающие животные по существу не реагируют на вторичную и третичную стимуляцию антигеном. Таким образом, по способности переходить к образованию антител IgG после вторичной стимуляции антигеном наблюдается четкое различие между отвечающими и неответающими животными. Как у отвечающих, так и у неответающих животных мы удаляли тимус (взрослые тимэктомированные, восстановленные костным мозгом животные). На рис. 11 показаны результаты, полученные при исследовании неответающей линии (СЗН), а на рис. 12 — отвечающей линии (СЗН·SW). Тимэктомия по существу не изменила иммунного ответа неответающих животных (см. рис. 11). На рис. 12 мы видим, что тимэктомия помешала переключению отвечающих животных на выработку IgG, т. е. сняв способность этих животных приобретать иммунологическую память.

На основании этих данных мы пришли к выводу, что тимусные клетки необходимы для выявления различия между отвечающими и неответающими животными, а следовательно, что Ig-гены проявляются в тимусных клетках. Напротив, тимэктомированные животные реагируют одинаково, будут ли они отвечающими или неответающими.

Далее, я хотел бы заметить, что Sheager опубликовал ряд весьма интересных опытов с аллогенным переносом. Однако, мне кажется, что алло-

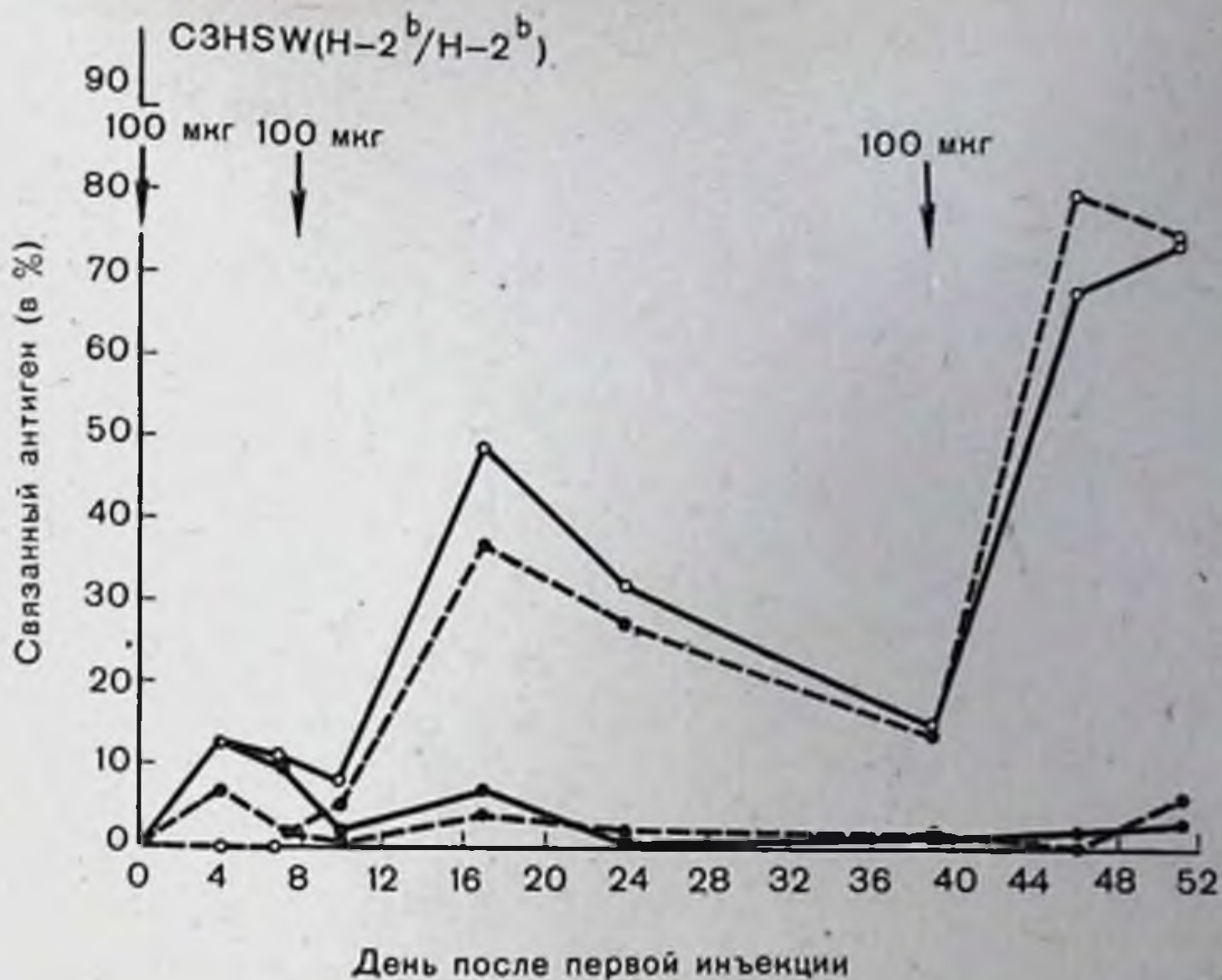


Рис. 12. Эффект тимэктомии на антителообразование и (Т, Г)-А--Л у отвечающих животных. Ответ взрослых тимэктомированных и ложнооперированных отвечающих мышей (СЗН. SW) на 100 мкг водного раствора (Т, Г)-А--Д, введенного внутрибрюшинно на «нулевой», 8-й и 39-й день. Общий пул антител ложнооперированных животных (пунктир и светлые кружки). Общий пул антител у тимэктомированных животных — сплошная линия и темные кружки, антителорезистентные к 2-меркаптоэтанолу у тимэктомированных животных — пунктир и черные кружки ("Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 190, p. 170).

генный перенос связан с одной трудностью, которая требует очень осторожной трактовки результатов.

Мы брали неответающих животных СЗН_Q(Н—2^q) и конгенных животных СЗН(Н—2^k). Обе эти линии не отвечают на (Т, Г)-А--Л. Обе линии дали только ответ IgM без переключения на IgG; гибриды F₁, как и родители, не реагируют. Интактным реципиентам F₁ переносили родительские или сингенные клетки в количестве, эквивалентном половине или целой селезенке. На рис. 13 изображен результат у контролей, получивших сингенные клетки F₁. В нулевой день всем мышам ввели 10,0 мкг (Т, Г)-А--Л. Кривая такая же, как у родителей и у гибридов F₁, не получивших клеток. Наблюдается только чистый ответ IgM. График 14 показывает реакцию гибридов F₁, получивших родительские клетки. Опять-таки все эти клетки неответающих животных лишены генов, обуславливающих ответ на (Т, Г)-А--Л как у донора, так и у реципиента. Если вводятся родительские клетки и, таким образом, одновременно с введением антигена начинается РТПХ, то у этих реципиентов F₁ наблюдается переход к выработке антител IgG (рис. 14). Аллогенный эффект был подробно описан Вепасеггаф и соавт. и именно так он проявляется в системе (Т, Г)-А--Л. По-видимому, своевременно вызванная РТПХ может индуцировать переключение к IgG. Этот эффект зависит также от доз, и если вводится меньше клеток, то образуется меньше антител IgG. Пока мы еще не перешли к опытам со значительно большими дозами клеток, но так или иначе, когда происходит перенос аллогенных клеток, например, как в опытах Shearer, надо очень осторожно трактовать результаты и определять, какие животные отвечают и почему.

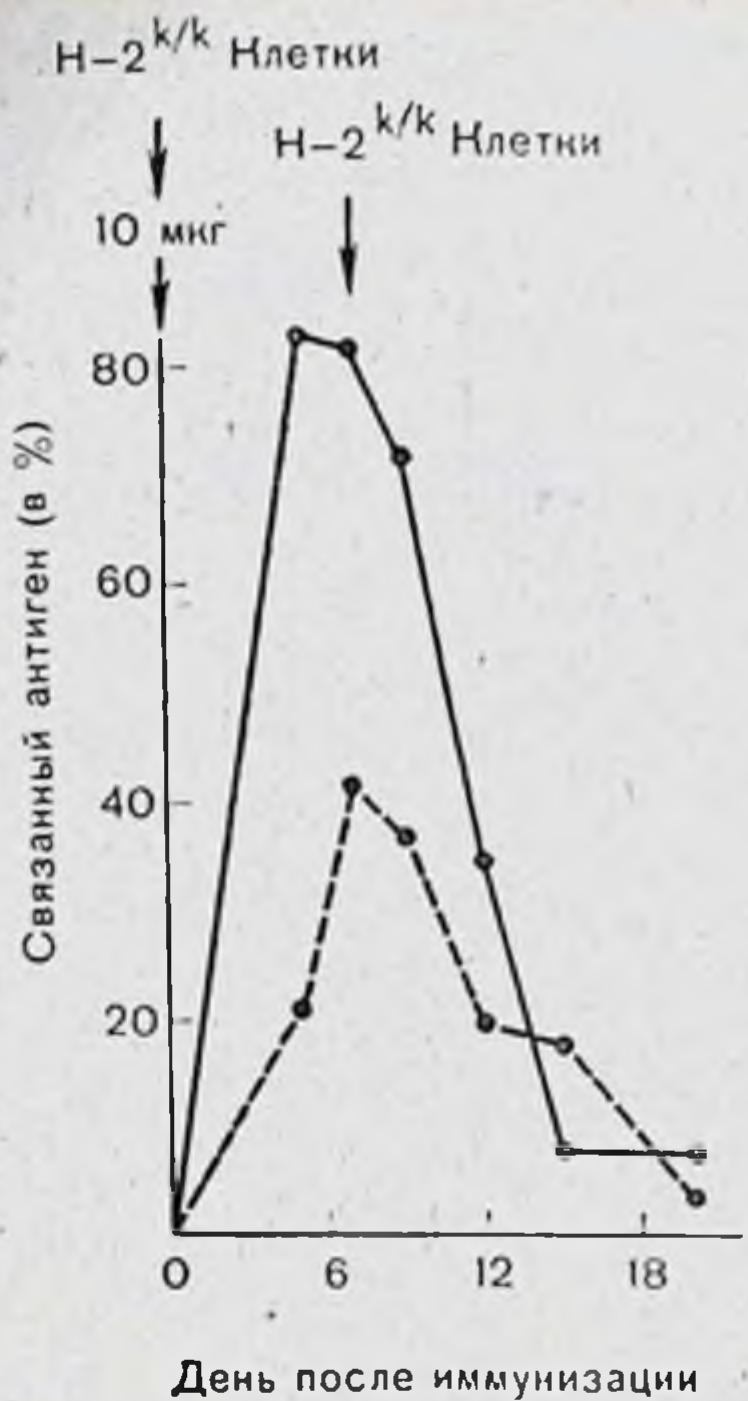
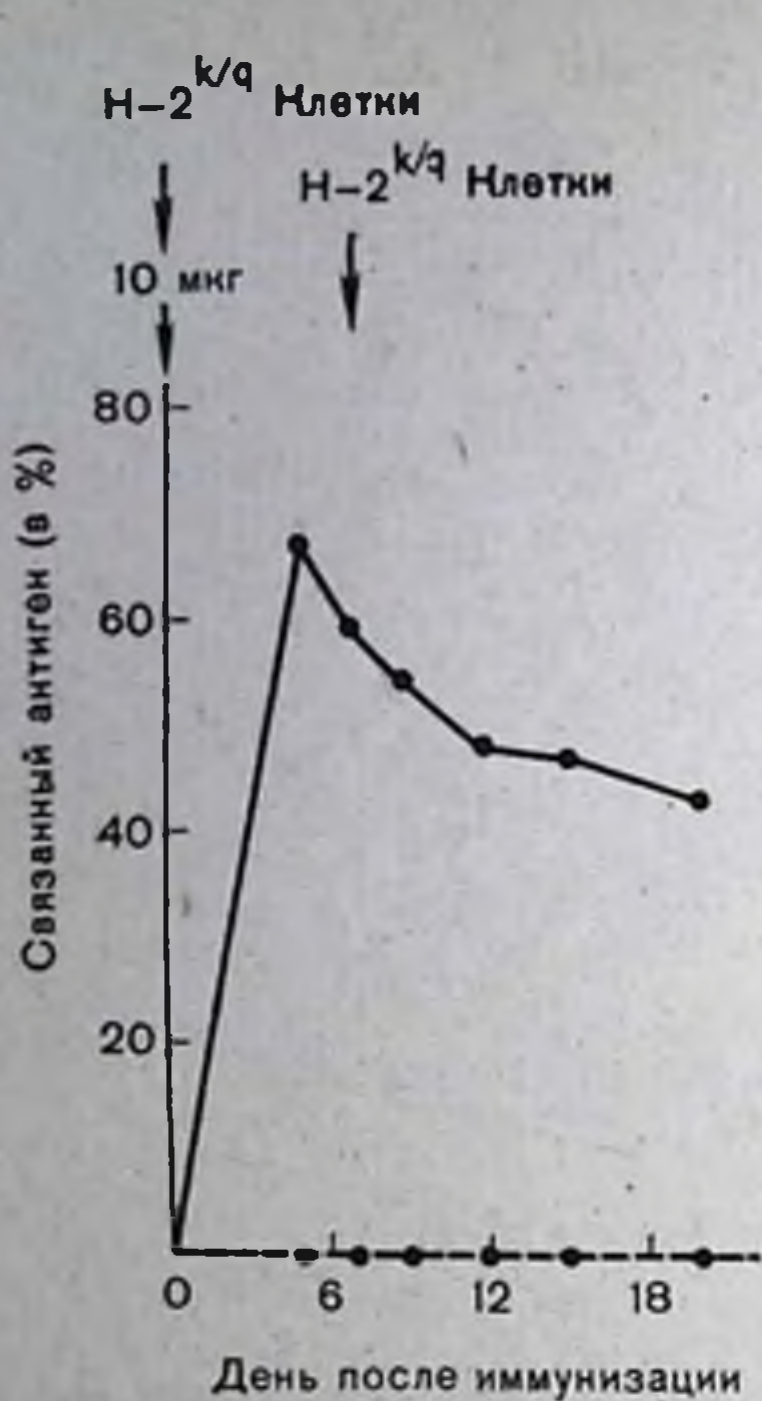


Рис. 13. Эффект сингенного переноса на синтез антител к (Т, Г)-А--Л у неответающих животных. Общий (сплошная линия) и резистентный к меркаптоэтанолу (пунктир) синтез антител у мышей линии (СЗНQ × СЗН/DiSn)F₁(H-2^{k/q}), которым ввели внутривенно 88×10^6 (H = 2^{k/q}) лимфоидных клеток (в «нулевой» и 7-й день) и иммунизированных (в «нулевой» день) внутрибрюшинно 10 мкг (Т, Г)-А--Л. Каждая точка — результат реакции с сывороткой, собранной от 5 мышей.

Рис. 14. Эффект аллогенного переноса на синтез антител к (Т, Г)-А--Л у неответающих животных. Общий (сплошная линия) и резистентный к меркаптоэтанолу (пунктир) синтез антител мышей (СЗНQ × СЗН/DiSn)F₁ (H—2^{k/q}), которым ввели внутривенно 150×10^6 H—2^{k/k} лимфоидных клеток (на «нулевой» день) и 208×10^6 H = 2^{k/k} лимфоидных клеток внутривенно на 8-й день после внутрибрюшинной иммунизации 10 мкг (Т, Г)-А--Л. Каждая точка — результат реакции с сывороткой, собранной от 5 мышей.

На основании этих и прежних данных я полагаю, что Ig-1 ген проявляется в Т-клетках, а не в В-клетках. Он мог бы также проявляться в В-клетках. Я не думаю, что мои данные подтверждают это предположение, но они не могут полностью его опровергнуть. Однако я считаю, что мои данные доказывают, что Ig-1 проявляется в Т-клетках, и что путем неспецифической активации Т-клеток (так я объясняю механизм аллогенного эффекта) родительские Т-клетки активируются чужеродным антигеном гистосовместимости реципиента F₁. Затем эти активированные Т-клетки действуют на соседние В-клетки, прореагировавшие с гаптенами и заставляют эти В-клетки переключиться к выработке антител IgG против гаптена или начать выработку этих антител. Опять-таки я считаю, что эти замечания имеют прямое отношение к данным Sheager, т. е. аллогенный эффект надо очень тщательно искать в опытах с переносом клеток.

Raff. Являлись ли клетки, которые стимулировались аллогенным эффектом в опытах Grumet, интактными или стимулированными В-клетками?

Grumet. Это интактные клетки. Следует заметить также, что если антиген не вводится, антитела не образуются.

Председатель Simonsen. Думаю, что сейчас было бы своевременно, если бы Schlossman выступил по вопросу о проявлении Ig-генов в Т- и В-клетках.

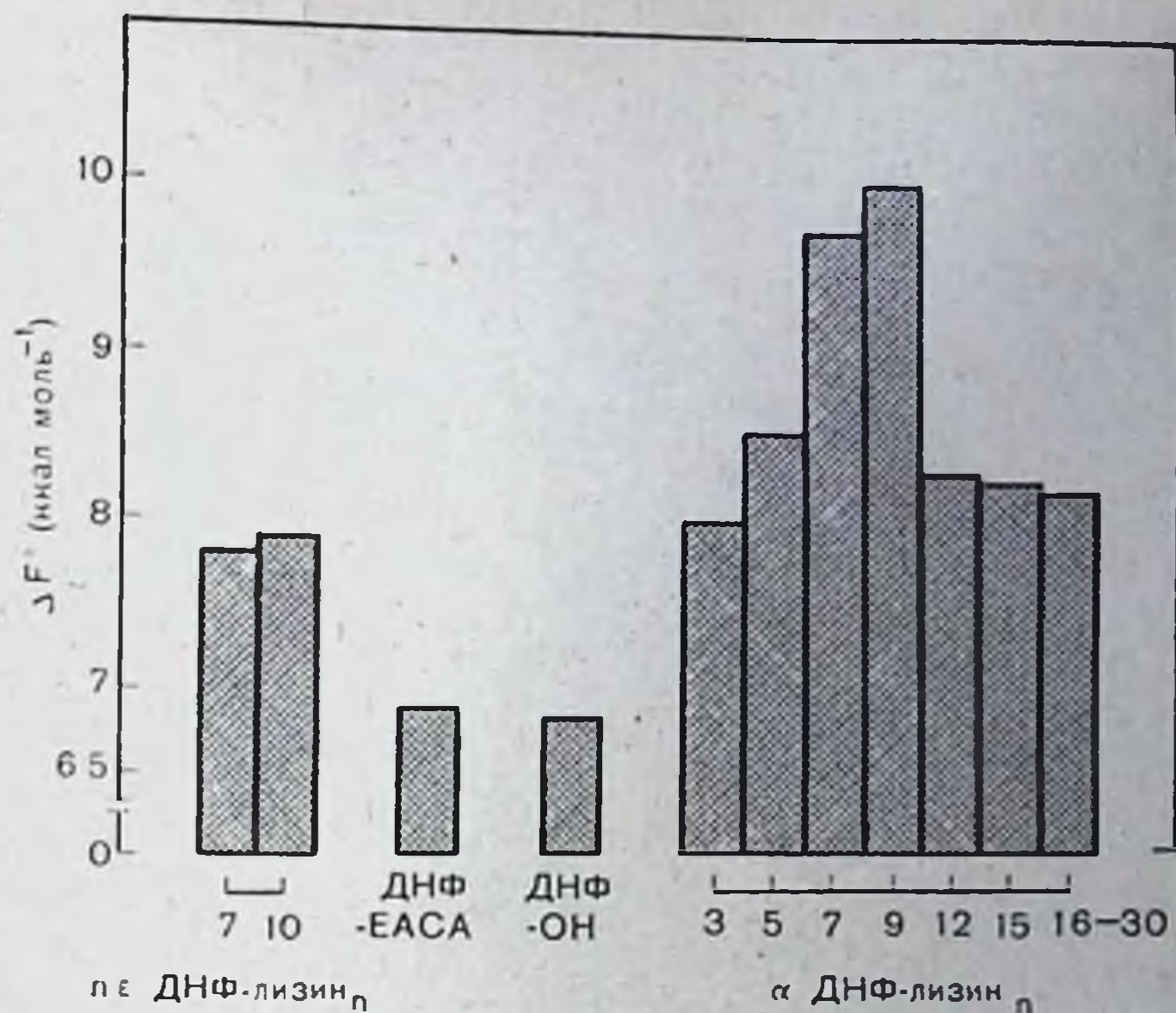


Рис. 15. Энергия связывания (ΔF°) α , ДНФ-лизин_n пептидов, p, ϵ — ДНФ-лизин_n пептидов, ДНФ- ϵ АСА и ДНФ-ОН с очищенными анти- α ДНФ-лизин-10-антителами от отвечающих животных в тексте погашения флюоресценции.

Schlossman. Benacerraf привел несколько убедительных доводов, указывающих, что Ig-ген проявляется в Т-клетках. Во многих опытах обнаружены опосредованные Т-клетками клеточные иммунные ответы у отвечающих животных и их отсутствие у неответающих животных. Однако пока еще не решен вопрос — может ли Ig-ген проявляться независимо от Т-клеток также на уровне В-клеток, т. е. влияет ли Ig-ген на специфичность вырабатываемых антител. Мы полагаем, что антитела отвечающих и неответающих животных, т. е. антитела, выработанные у животных, не имеющих соответствующего Ig-гена, могут быть различными, но только на протяжении примерно последнего года были разработаны достаточно чувствительные методики, чтобы выявить эти различия (Levine e. a. «J. Exp. Med.», 1971, v. 133, p. 1199).

Морские свинки иммунизировались определенными пептидами в различных адьювантах и разделялись на отвечающих и неответающих на основании положительной или отрицательной замедленной кожной пробы. Антитела против ДНФ-олиголизина были очищены на иммуносорбенте ДНФ-БСА и очищенные антитела исследовались на специфичность при помощи флюоресцентного метода погашения с многочисленным набором родственных ДНФ олигопептидов. Все отвечающие животные как имбредной линии 2, так и аутбредного стока Hartley вырабатывали популяцию молекул антител, которая отличалась от антител, продуцируемых неответающими животными. Антитела отвечающих животных «распознавали» гомологичный иммунизирующий антиген посредством специфического увеличения энергии связывания с ним. Например, антитела против α , ДНФ-Лиз₇₋₁₀ легко отличали α , ДНФ-Лиз₇₋₉ от α , ДНФ-Лиз₅ или от α , ДНФ-Лиз₁₂. Общий ΔF° этой реакции составлял около 10 ккал (рис. 15). Эта необычная специфичность наблюдается независимо от адьюванта, использованного для стимуляции ответа, и характерна для антител, вырабатываемых у животных, имеющих Ig-ген. Антитела отвечающих животных различают не только положение гаптена, но и точную длину цепочки лизинов, использованных

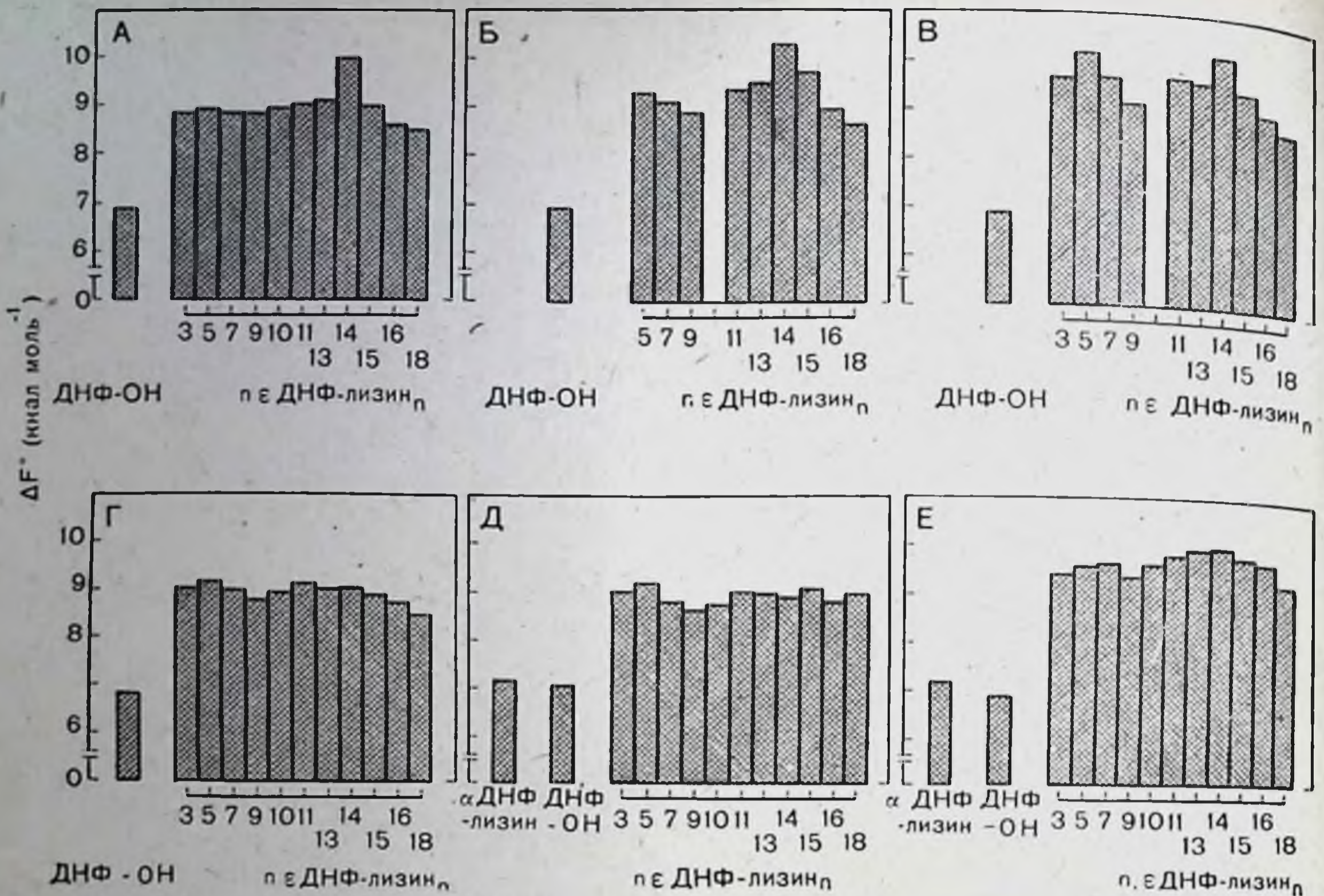


Рис. 16. Энергия связывания (ΔF°) пептидов, α , ДНФ-лизин₇ и ДНФ-ОН с антителами анти-14, ϵ , ДНФ-лизин₁₄, отвечающих (вверху А, Б, В) и неответающих (внизу Г, Д, Е) морских свинок.

для индукции иммунного ответа. Как показано на рис. 16 (а, б, в), антитела отвечающих животных против 14, ϵ , ДНФ-Лиз₁₄ весьма специфичны для этого вещества. ΔF° для 14, ϵ , ДНФ-Лиз₁₄ по крайней мере на 550 кал/моль больше, чем для 13, ϵ , ДНФ-Лиз₁₃ или 15, ϵ , ДНФ-Лиз₁₅.

Эта система была применена для определения специфичности антител, продуцированных неответающими животными при такой же иммунизации. Как показано на рис. 16 (г, д, е), антитела неответающих животных против 14, ϵ , ДНФ-Лиз₁₄ не дают пика энергии связывания с 14, ϵ , ДНФ-Лиз₁₄ и не могут отличить гомологичный иммунизирующий антиген от близко родственных пептидов. «Неответающие антитела», несмотря на отсутствие специфичности, имеют общую энергию связывания ДНФ-пептидов примерно такую же, как антитела отвечающих животных.

У неответающих животных были исследованы антитела к ряду ДНФ-олиголизиннов, и все они лишены специфичности, характерной для антител отвечающих животных, т. е. они не могут отличить гомологичный иммунизирующий антиген от близко родственных антигенов. Эти опыты позволяют думать, что животное, не имеющее Ig-гена, лишено не только популяции Т-клеток, но и популяции В-клеток, способной вырабатывать высоко специфические антитела. С другой стороны, отвечающие животные, по-видимому, имеют специфические рецепторы к определенным ДНФ-олиголизинам как на В-клетках, так и на Т-клетках. Можно было бы предположить, что разница между Ig-положительными и Ig-отрицательными животными (по гену ПЛЛ) принадлежит только Т-клеткам и что обнаруженная разница по специфичности антител отражает тот механизм, посредством которого Т-клетки «предъявляют» антиген соответствующим В-клеткам. Эта теория

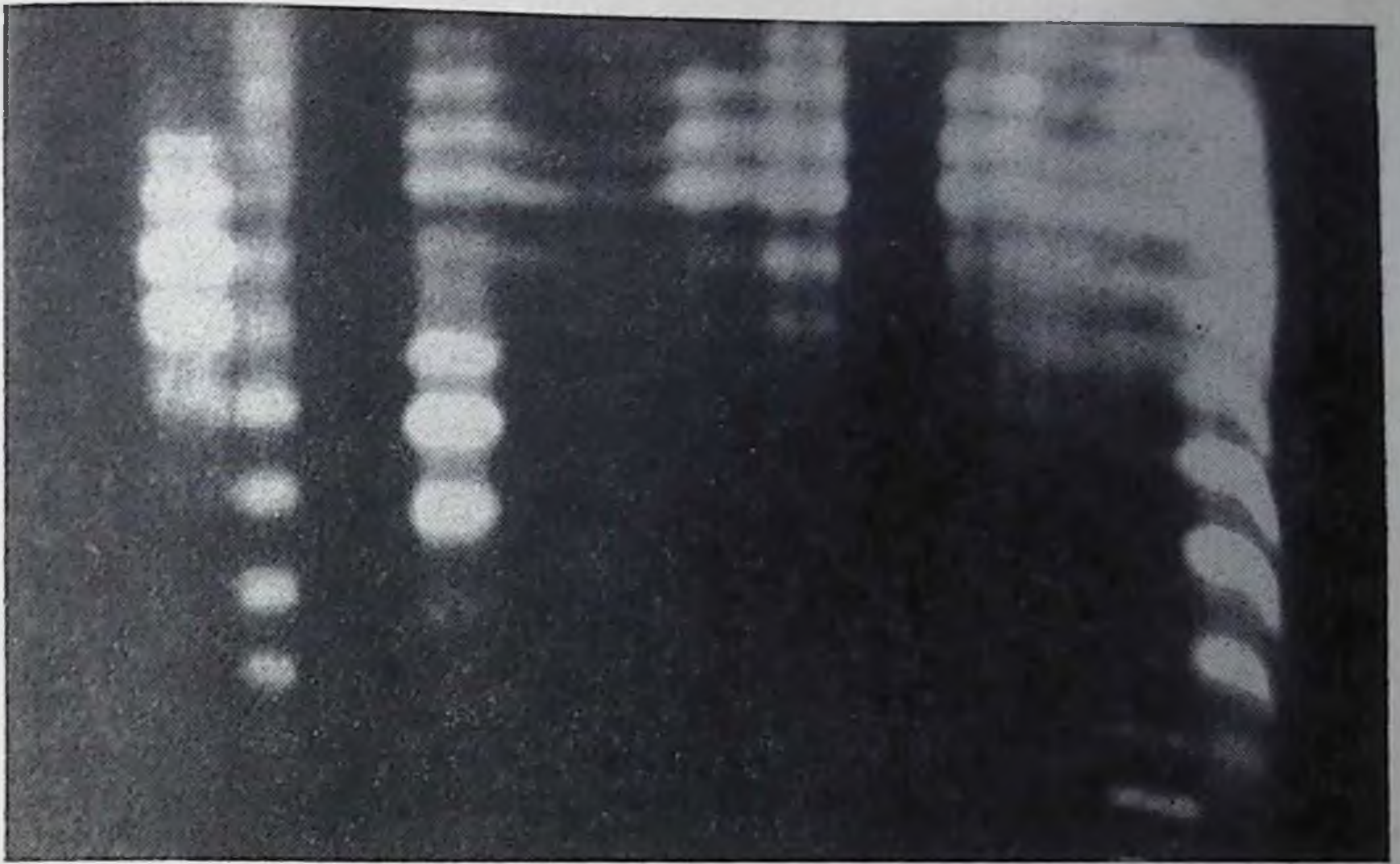


Рис. 17. Изоэлектрический спектр анти- α -ДНФ-лизин₁₀ антител. Каждая вертикальная полоса — антитела, синтезируемые одним животным. Обратите внимание на частоту повторений одинаковых клонов и гомогенность антител.

предполагает, что пул В-клеток идентичен у отвечающих и неответающих животных. Недостаток специфических Т-клеток у животных, не имеющих Ig-гена, ведет к селекции разных популяций антигенчувствительных В-клеток. Таким образом, при наличии соответствующих Т-клеток происходит селекция специфической популяции В-клеток, которые не селектируются в отсутствие специфических Т-клеток.

Недавно Williamson и я пытались охарактеризовать пул В-клеток у отвечающих и неответающих животных. Ввиду необычайной специфичности антител, вырабатываемых против определенных ДНФ-олиголизин, можно было предположить, что эти антитела имеют ограниченную гетерогенность. Мы провели изоэлектрическое фокусирование большого количества антисывороток против определенных ДНФ-олиголизин, и как и ожидалось, эти антисыворотки отличаются ограниченной гетерогенностью (рис. 17). Примерно 50 морских свинок были иммунизированы α_1 ДНФ-Лиз₁₀ и меньшее количество другими определенными антигенами. В среднем каждое животное вырабатывает 2 клон антител, согласно данным изоэлектрического фокусирования, реакции с ¹³¹I-ДНФ-лизин и радиоавтографии. Количество клонов антител к α_1 ДНФ-Лиз₁₀ на каждое животное колеблется от 1 до 3 и в общем не зависит от использованного адьюванта. С другой стороны, такие сложные антигены, как ДНФ-БГГ или ДНФ-БСА вызывают гетерогенный ответ, характеризуемый очень большим количеством клонов.

McDevitt. Что имеет Schlossman в виду, когда он говорит о качественно различных клонах антител?

Schlossman. Мы искали антитела уже через 10 дней после иммунизации и наблюдали за ответом более четырех месяцев. Согласно предварительным результатам, клональный тип может оставаться относительно постоянным

долгое время после иммунизации. В основном мы пытались определить клональный тип антител, выработанных против α , ДНФ-Лиз₁₀, у отвечающих животных, с тем, чтобы определить размеры набора V-генов. Вместе с тем мы изучали клональный тип антител, вырабатываемых у неответающих животных на идентичные антигены. Одна из трудностей, с которой мы встретились, заключалась в отсутствии инбредных морских свинок в Mill Hill. Для того чтобы определить тип ответа, нам приходилось ставить замедленные кожные тесты на определенные ДНФ-олиголизины. Морские свинки линии 2 в Mill Hill по существу являются линией Heston 2, тогда как животные линии 13 выведены из линии национального института здравоохранения. Несмотря на смешение родословных морских свинок и на то, что некоторые животные линии 13 являлись отвечающими, получены весьма впечатляющие результаты. Хотя мы иммунизировали большое количество животных, лишь некоторые животные были тщательно исследованы. Морским свинкам вводили антиген ϵ , ДНФ-Лиз₁₀, в полном адьюванте Фрейнда, содержащем *Mycobacterium butyricum*, *M. tuberculosis* H37Ra (2 мг/мл), *M. tuberculosis* H37Ra (10 мг/мл), *M. tuberculosis* H37Rv. Несмотря на колебания в количествах вырабатываемых антител, число индуцированных клонов в основном не зависело от использованного адьюванта. Самый сильный из адьювантов H37Rv лишь незначительно увеличивал гетерогенность клонального ответа.

Общие данные о клональном характере этих ответов приведены в табл. 20. В одной группе из 12 отвечающих морских свинок, иммунизи-

ТАБЛИЦА 20

Изоэлектрическое фокусирование анти- α -ДНФ-Лиз₁₀ антител, выявленных у морских свинок

Иммунный статус морских свинок	Число клонов — n раз						
	1	2	3	4	5	6	7
Всего исследованных морских свинок (17)	14	1	2	1	—	—	1
Отвечающие (12 животных)	10	2	1	—	—	—	1
Неотвечающие (5 животных)	5	—	2	—	—	—	1

рованных α , ДНФ-Лиз₁₀, мы обнаружили всего 24 клон. В этой группе один клон был обнаружен у семи разных животных. Другие клоны мы встречали 4, 3 и 2 раза соответственно. Ряд клонов наблюдался только один раз. Естественно, нам требуется больше данных, чтобы определить размер набора V-генов у этих животных. Однако частота идентичных повторов позволяет думать, что этот размер невелик и что он соответствует набору генов зародышевых клеток.

Wilson. Сколько клонов было у неответающих животных?

Schlossman. Мы исследовали меньшее количество неответающих животных. По существу мы собрали полные данные только у пяти животных, у которых всего найдено 9 клонов (опять-таки в среднем по два на животное). Было интересно отметить, что у неответающей группы из 5 животных два разных клон повторялись три раза (см. табл. 20). Частота повторов среди неответающих животных высокая и подобна частоте повторов у отвечающих животных. С частотой повторов у отвечающих и неответающих животных.

связан один важный вопрос. Некоторые клоны повторяются как у отвечающих, так и у неответающих животных, но у нас пока нет достаточных данных, чтобы определить, насколько совпадают наборы V-генов этих животных. Важнее всего то, что мы не определили, какие клоны антител ответственны за специфичность и имеются ли совпадения в этой группе. Изучение специфичностей позволяет думать, что у отвечающих животных должны быть клоны, которых нет у неответающих животных. Но, возможно, что в этих опытах могут быть не замечены малые количества высоко специфических антител у неответающих животных.

McDevitt. Когда Schlossman говорит о повторях, имеет ли он в виду идентичные клоны?

Schlossman. По всей вероятности, клоны были идентичны. Но наши данные пока основаны только на идентичной миграции из электрического фокусирования. Ввиду смешанных родословных и отсутствия полного инбридинга у животных, с которыми мы работали, не удивительно, что у отвечающих и неответающих животных имеются общие идентичные V-гены. Однако пока мы не можем сказать, является ли вполне идентичным пул В-клеток у этих животных¹.

Bodmer. Я хотел бы высказаться по упомянутому McDevitt вопросу о генетическом контроле различных феноменов иммунного ответа и о том, функционируют ли Ig-гены на Т- и В-клетках. Мы пытаемся определить генетический контроль возможного эффекта на В- и Т-клетках, просто изучая ассоциации между разными линиями или разными животными и иммунологические параметры, связанные с функцией В- и Т-клеток. Я думаю, что при таком упрощенном подходе к проблеме, надо быть очень осторожным. Прежде всего надо сказать, и это особенно относится к Schlossman, который работал не с конгенными линиями, что он, безусловно, не знает, являются ли генетические различия теми же различиями, которые сцеплены с главной системой гистосовместимости. Но даже если работать с конгенными линиями было бы возможно, неправильно говорить о каком-то одном Ig-гене. Несомненно, это будет отмечено на следующей сессии. Известно, что в этом

¹ Редакторы знают, что работа, упомянутая в выступлении Schlossman, была закончена вскоре после совещания в Brook Lodge, поэтому они предложили Schlossman привести краткое примечание так, чтобы результаты были полностью отражены в окончательном виде. Эти результаты таковы: 1) 36 морских свинок, иммунизированных е, ДНФ-Лиз₁₀, дали 57 различных клонов, выявленных с помощью метода изоэлектрического фокусирования; 2) 20 отвечающих животных дали 39 разных клонов, 13 неответающих животных образовали 18 разных клонов; 3) один клон обнаружен 10 раз у 10 различных отвечающих животных; тот же клон, согласно критериям изоэлектрического фокусирования, встречался 7 раз у неответающих животных; 4) другие клоны повторялись 6—4—3—3—3—3 раза, и все эти клоны были поровну распределены между отвечающими и неответающими животными, т. е. каждый из этих клонов, который был найден более чем у одного животного, встречался как у отвечающих, так и у неответающих животных. Таким образом, клоны антител у отвечающих и неответающих животных, видимо, идентичны и пул генов вариабельной области для антител к е, ДНФ-Лиз₁₀, видимо, идентичен у отвечающих и неответающих животных.

Schlossman сообщил нам, что он не может объяснить различия, существующие, по его мнению, между антителами отвечающих и неответающих животных к определенным пептидам, упомянутые в начале его выступления. Он считает, что эти различия, возможно, объясняются небольшой фракцией антител, которые трудно определить методом изоэлектрического фокусирования. Однако Schlossman полагает, что эти данные позволяют решить одну важную проблему: у отвечающих и неответающих животных в общем имеется идентичная популяция В-клеток, за исключением, может быть, небольшого пула антительных клонов, которые имеются у отвечающих животных вследствие селекции соответствующими Т-клетками или из-за «абсолютной» разницы между отвечающими и неответающими животными. Это наблюдение контрастирует с совершенно иным характером ответа Т-клеток на тот же антиген. — П р и м. р е д.

комплексе очень большое количество генов. Все они тесно сцеплены, поэтому возможно, что существует набор генов, влияющих на В-клетки и другой набор генов, влияющих на Т-клетки. Оба набора могут быть сцеплены с Н-2, но не разделены у той линии, которую мы изучаем. Пока мы не сможем провести точный анализ тонкой структуры и обособить различные области в Н-2, а также получать линии, конгенные во всех отношениях. Мы не можем утверждать, что одни и те же гены действуют на Т- и В-клетки. Я считаю, что этот вопрос очень важен. Мы постоянно ищем корреляции между различными группами животных с определенным набором маркеров, например, «Н-антигенами», которые не являются антигенами, действительно вызывающими изучаемый эффект. Эта проблема аналогична той, которую мы уже рассматривали раньше — о связи у беспородных морских свинок между типом гистосовместимости и ответом на некоторые антигены. Иногда эта связь точная, иногда же не столь точна. Причина в том, что в некоторых случаях мы возможно исходим из первоначального набора генов весьма ограниченного по количеству рекомбинационных событий. У нас не было времени получить все комбинации и, таким образом, мы находим ассоциацию. В других случаях первоначальный набор имеет множество различных комбинаций, которые сохраняются и поэтому мы не обнаруживаем ту же степень ассоциаций. Иными словами, Schlossman ищет ассоциации, обусловленные сцеплением. Не входя в алгебру этой проблемы, я просто хочу подчеркнуть, что это сложный вопрос и что очень тесно сцепленные гены возможно ассоциируются в случайном порядке, в случайных популяциях, но для того, чтобы это произошло, требуется много времени. Практически я хочу сказать, что это надо учитывать при изучении разных тесно сцепленных генов. Ассоциация между ними может быть довольно прочной в течение длительного времени.

Таким образом, я считаю, что едва ли можно говорить об одних и тех же генах, действующих на уровне В- и Т-клеток.

Schlossman. Я согласен, что эта проблема в опытах с морскими свинками еще не решена. Однако ее можно решить созданием инбредных линий более «высокого качества», а также изучением антител у аутбредных животных, чтобы определить сцепление с антигенами гистосовместимости.

Vodmer. Возможно. Однако очень важна логическая сторона вопроса, а именно: может ли проявляться один и тот же набор или группа генов одновременно в В- и Т-клетках или один набор генов проявляется в Т-клетках, а другой набор в В-клетках. На мой взгляд, это важное разграничение, так как при этом возникает вопрос о контроле проявления этих генов. В одном случае проявление генов ограничено разными типами клеток, несмотря на их тесное сцепление, а в другом случае один и тот же набор генов может действовать на обоих типах клеток. Я считаю, что представленные данные еще не могут провести грани между двумя этими возможностями.

Председатель Simonsen. Может ли Vodmer предложить какие-либо определенные эксперименты?

Vodmer. Я думаю, что нам надо пользоваться линиями, полученными исследователями, которые работают с Н-2. Они выделили разные области комплекса Н-2 и получили линии мышей, конгенные по этим областям. Тогда мы сможем ответить на этот вопрос. Конечно, мы должны также идентифицировать продукт гена.

Председатель Simonsen. Но может быть эти области, входящие в комплекс Н-2, включают много генов?

Venacegraf. Я хотел бы отдать должное Schlossman, который поставил великолепный опыт. Этот опыт в некотором смысле может быть примером

того, что я говорил в своих вступительных замечаниях. Для изучения генетики В-клеток необходима иммунизация антигенами, способными индуцировать ответы с ограниченной гетерогенностью антител. Именно это сделал Schlossman. Типы клональных ответов на такой антиген у двух инбредных линий животных, например, у морских свинок линий 2 и 13, должны быть различными, так как геномы их различны. Именно такой результат получил Schlossman. Однако, прежде чем сделать вывод о том, что клональный тип, наблюдаемый у отвечающих животных, иммунизированных ДНФ-олиголизинами, обусловлен геном ПЛЛ, надо доказать, во-первых, что этот тип у линии 2 наследуется вместе с геном ПЛЛ в потомстве от обратного скрещивания, во-вторых, что клональный тип линии 2 можно обнаружить также при ПЛЛ-зависимом ответе у беспородных животных.

Schlossman. Мы не анализировали клоны антител у Ig-положительных аутбредных животных и в потомстве от обратного скрещивания. У аутбредных животных, иммунизированных α -ДНФ-Лиз₁₀, были получены сыворотки, но они не подвергнуты анализу. Я считаю, что надо подчеркнуть следующее: во всех случаях, когда мы обнаруживаем эту необычайную специфичность продукта В-клеток (и очевидно рецептора), то мы видим такой же уровень специфичности Т-клеток. Если специфичность отсутствует у Т-клеток, как у Ig-отрицательных животных, то, по-видимому, она отсутствует и у В-клеток. Неожиданным оказался тот факт, что Ig-отрицательные животные (ПЛЛ-неотвечающие) продуцируют такие «ограниченные» антитела. Я думал, что в отсутствие Т-клеток мы получим более гетерогенный антительный ответ. Ограничение гетерогенности у неотвечающих животных эквивалентно ее ограничению у отвечающих.

Nisonoff. Каковы примерные титры антител в мкг/мл?

Schlossman. Я не могу точно ответить на этот вопрос, но в первых опытах титры составляли от 100 до 500 мкг/мл антител в зависимости от применяемого адьюванта.

Sela. Williamson, работавший с конъюгатами ДНФ-белок, обнаружил у мышей огромное количество белков особой структуры, способных связывать ДНФ. Не проверял ли Schlossman таким же образом 15—20 разных морских свинок путем инъекции таких конъюгатов? Можно ли допустить, что у морских свинок пул различных клонов, продуцирующих антитела к ДНФ, значительно более ограничен и что одинаковых клонов значительно больше, чем у мышей?

Schlossman. Williamson и я искали антитела и к ДНФ-СА и к ДНФ-БГГ у морских свинок и убедились, что эти антигены индуцируют очень большое количество клонов. Напротив, мы проводили иммунизацию многими определенными ДНФ-пептидами и убедились, что клональный тип всегда ограничен. Пока еще не решен вопрос о том — индуцирует ли α -ДНФ-Лиз₁₀ те же клоны, как и, например, α -ДНФ-Лиз₁₂. По-видимому, это не так, поскольку мы видим различие в специфичности этих антител.

Green. Я хотел бы отметить еще одну разницу между отвечающими и неотвечающими животными, относящуюся к их ответу на ДНФ поли-лизин или ДНФ-ПЛЛ-БСА. Я имею в виду сроки появления антител. У животных, отвечающих на ДНФ-ПЛЛ, антитела появляются примерно на 5 дней раньше, чем у неотвечающих животных, при иммунизации ДНФ-ПЛЛ-БСА. Таким образом, мы видим еще одну существенную разницу в отношении отдельных животных к этим антигенам. Я хотел бы задать Schlossman вопрос, связанный с тем, о чем говорил нам ранее Venesegat, а именно, что любой гаптен, соединенный с ПЛЛ, может вызвать образование антител у отве-

чающих животных. Как согласовать это с предположением, что ген иммунного ответа на полилизин может действовать в В-клетках, ведь различные гаптены вызывают образование многих различных антител?

Schlossman. При изучении специфичности мы анализировали антитела отвечающих животных, полученные примерно к 15 пептидам. Все животные вырабатывали антитела, которые согласно методу погашения могут различать гомологичные и гетерологичные антигены. Основываясь на этом, можно допустить, что общий пул V-генов очень большой. Однако этот вопрос быть может будет решен путем изучения клонирования при сравнении ответа на разные пептиды.

Bodmer. Да, по крайней мере мы могли бы получить положительный ответ. Возможно, что функции Т- и В-клеток удастся отчасти разделить. Если же их разделить не удастся, то можно будет допустить, что изучаемый участок хромосомы разделен недостаточно тонко.

Serpellini. Ранее я упоминал простой опыт, который мы должны были давно поставить и который легко может поставить Green. Он позволит дифференцировать Н-антигены от других структур, которые возможно контролируются Ig-генами. Следовало бы поглощать аллогенные антисыворотки нелимфоидными тканями, например фибробластами. Однако следует помнить, что гуморальные антитела, образующиеся после пересадки почек, могут блокировать MLC и, возможно, проявление Ig-генов в модели Green. По крайней мере этого результата я бы ожидал. Если блокирующая активность этих антител не индуцируется переносимыми лимфоцитами, то, очевидно, она означает либо что блокирование осуществляется через Н-антигены, либо что на почечных тканях проявляются также гены MLC, а следовательно, Ig-гены.

Я хочу покинуть эту конференцию с хорошо обученными «В-клетками» (от слова мозг — brain), поэтому разрешите мне задать еще один наивный вопрос. MLC у интактной особи, т. е. у особи, которая, насколько известно, не была иммунизирована аллогенным Н-антигеном при беременности, пересадке и т. д., соответствует первичному ответу *in vitro*. По крайней мере у такой особи не образуется гуморальных антител к Н-антигенам. Я согласен допустить, что ответ MLC полностью обусловлен Т-клетками. Но активация *in vitro* такими растворимыми антигенами, как туберкулин или столбнячный анатоксин, требует предварительной сенсбилизации *in vivo*, которая часто сопровождается образованием гуморальных антител. Можем ли мы быть уверены, что во втором случае действуют только Т-клетки? Можем ли мы с полной уверенностью исключить роль В-клеток? На этот вопрос необходимо ответить.

Green. Да, я думаю, что могу привести убедительные данные в ответ на вопрос Serpellini. Вместе с Eifenbein и Shevach в Национальном институте здравоохранения мы изучали клетки лимфатических узлов морских свинок в процессе бласттрансформации, вызванной яичным альбумином. После 3—4 дней культивирования *in vitro* с антигеном мы могли обнаружить лимфоциты с рецепторами для комплемента (КРЛ) (функция В-лимфоцитов) и одновременно наблюдать включение ^3H -тимидина, что является функцией Т-лимфоцитов. Затем мы осаждали клетки на предметных стеклах и искали клетки, содержащие метку (Т-клетки) и клетки с розетками (КРЛ — положительные лимфоциты или В-клетки). Интересно, что около 20% всех клеток с меткой также образовывали розетки. Следовательно, когда мы получаем от морских свинок эти культуры лимфатических узлов, то значительное количество общего включения ^3H -тимидина приходится на В-клетки и, следовательно, степень пролиферации в этих культурах нельзя

рассматривать как точный показатель функции Т-клеток, так как в ней может участвовать то или иное количество В-клеток. Я уверен, что если бы этот опыт был поставлен на кроликах, то можно было бы получить еще более выраженный, а следовательно, еще более четкий ответ.

Uhr. Поскольку комплексы антиген—антитела могут стимулировать лимфоциты, нельзя ли допустить, что в опытах Green В-клетки стимулировались неспецифически комплексом яичного альбумина с антителами против него, а не специфически яичным альбумином?

Green. Это предположение нельзя исключить полностью. Однако это предположение можно отнести к любой системе, в которой используется смешанная популяция клеток лимфоузлов морских свинок, содержащая клетки, секретирующие антитела. Поэтому я не могу точно сказать, каков механизм этой стимуляции В-клеток. Я лишь отмечаю тот факт, что количество клеток, наблюдаемое по включению ^3H -тимидина, отражает отчасти и пролиферацию В-клеток. Я согласен с Uhr, что предполагаемый им механизм возможен, но он возможен в любой антигенной системе. В системах *in vitro* содержится небольшое количество клеток, вырабатывающих антитела. Эти антитела образуют комплекс с антигеном, и иммунные комплексы в той или иной мере взаимодействуют.

Председатель Simonsen. Мы приближаемся к концу этой сессии и мне кажется ввиду представленной информации и в результате наших дискуссий теперь уже нет сомнений в том, что Ig-гены проявляются в Т-клетках, с другой стороны, нет единого мнения о том, могут ли они проявляться также и в В-клетках. Я хотел бы спросить Venesegraf и Green, которые представили основную информацию на этой сессии, убеждают ли их данные, с которыми выступили другие ораторы, что Ig-гены могут проявляться также на В-клетках?

Venesegraf. Ig-гены, сцепленные с гистосовместимостью, видимо, в некоторых случаях влияют на специфичность образованной популяции антител. Можно назвать много примеров этого феномена, означающего, что ген оказывает некоторое влияние на специфическую мобилизацию В-клеток. Однако этот феномен можно объяснить рядом предположений, кроме обязательного проявления продукта Ig-гена на поверхности В-клеток, как я и сказал в своих вступительных замечаниях. Все же эту возможность надо учитывать.

Председатель Simonsen. Согласен ли Green с ответом Venesegraf?

Green. Я склоняюсь к мысли, что гены иммунного ответа проявляются исключительно или преимущественно в Т-клетках и что их воздействие на специфичность антител связано с узнаванием антигена или с взаимодействием с ним. Антиген имеет сложную структуру, многие его компоненты различаются в той же мере, как детерминанты носителя и гаптенные детерминанты, поэтому я считаю, что иммунологический аппарат, представленный Ig-геном, может распознать специфический участок на антигенной молекуле как участок с функцией носителя, но при этом создаются благоприятные условия для специфичности антител к сегменту (гаптenu) близ участка с функцией носителя и, следовательно, та специфичность, которую распознает В-клетка, в некотором смысле определяется специфичностью иммунологического аппарата, т. е. участком с функцией носителя на антигене, который распознается Ig-геном. На мой взгляд, этим можно объяснить переменчивость тонкой специфичности антител к антигенным детерминантам, не привлекая обязательно для объяснения проявление Ig-генов на В-клетках. Однако я готов признать, что это только мое личное мнение.

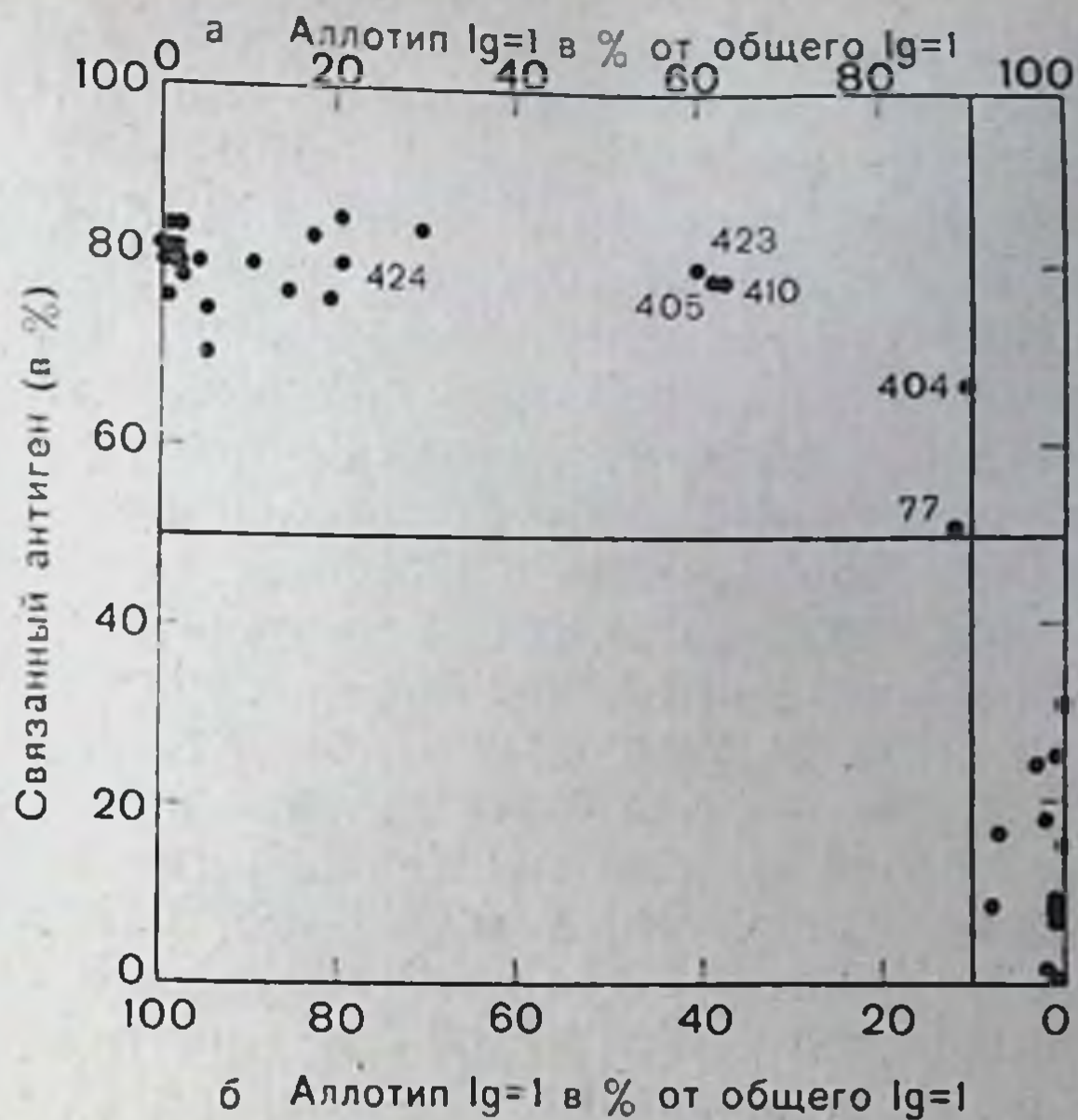
Председатель Simonsen. Согласен ли с этим Schlossman?

Schlossman. Я согласен с Green в том смысле, что он выражает свое субъективное мнение. Я считаю, что надо собрать больше данных. Могу повторить, что в нашей системе аффинитет антител одинаков у отвечающих и неответающих животных. Ввиду частоты повторов у неответающих животных, можно полагать, что они имеют собственный пул V-генов и что T-клетка видимо не играет роли в селекции B-клеток, но увеличивает интенсивность B-клеточного ответа. Ig-ген, по крайней мере у отвечающих животных, проявляется как на T-, так и на B-клетках.

Председатель Simonsen. Я особенно хотел бы ознакомиться с мнениями еще двух участников нашего заседания Sela и McDevitt.

Sela. Я думаю прежде всего, что вопрос председателя Simonsen был неточным. Лучше было бы подчеркнуть, что имеются в виду иммунные ответы, сцепленные с H-2 или просто с тканевой совместимостью. Думаю, что именно это он имеет в виду, а именно, проявляются ли иммунные ответы, сцепленные с H-антигенами в T-клетках или в B-клетках или в обоих типах клеток? На основании всех впечатлений, сложившихся в ходе этой первой сессии, а также собственного опыта, независимо от того, назовем ли мы его субъективным мнением или просто мнением, я мог бы сказать, что T-клетка безусловно является главным виновником, по крайней мере во многих случаях. Однако я признал бы, что кооперация между клетками, косвенно вовлекающая и B-клетки, также может играть важную роль, иными словами, я пока еще не отрицаю роли B-клеток.

McDevitt. Думаю, что даже Вепасеггаф признал бы, что все указания на исключительное проявление Ig-генов на T-клетках являются косвенными и основанными на феноменологии и частной интерпретации этой феноменологии. То же можно сказать, как только что заметил Green, о многих данных, касающихся специфичности антител и тестов с лимитирующими разведениями. Таким образом, доказательства того, что Ig-гены проявляются на обоих типах клеток, также лишь косвенны. Мне кажется, что все мы, полагающие, что Ig-гены являются генетической системой только T-клеток, обязаны в полной мере доказать свое мнение. Иными словами, мы должны доказать, что отвечающие T-клетки могут активировать неответающие B-клетки и индуцировать образование специфических антител. Если такой опыт нам удастся и если мы сможем исключить аллогенный эффект и эффект аллотипа (пользуясь соответствующими конгенными линиями), то тогда мы получим очень убедительные доказательства. Мы пытались осуществить этот опыт в течение последних 2—3 лет, пользуясь как облученными химерами, так и позднее тетрапарентальными мышами, выведенными при слиянии эмбрионов на стадии расщепления восьми клеток от двух разных линий с последующей реимплантацией в матку ложнобеременного реципиента. До самого последнего времени все наши данные говорили о том, что у мышей, созданных путем слияния эмбрионов от отвечающей и неответающей линии, все продуцируемые антитела имели аллотип отвечающей линии, даже в тех случаях, когда во фракции сывороточных иммуноглобулинов, не содержащей антиген, содержалось значительное количество иммуноглобулина неответающей линии. Я не хотел бы говорить о предварительных результатах в области, которую я считаю основной для решения этого вопроса, но все же некоторые из наших последних наблюдений означают, что быть может дело обстоит не всегда так. В последней группе из 44 мышей, полученных при слиянии эмбриона от слабо отвечающей линии СЗН и эмбриона от конгенной сильно отвечающей линии СВВ, получены несколько иные результаты. Большинство



Аллофенные мыши	Общий сывороточ- ный Ig=1		Специфический анти (Т,Г)-А--Л		Уровень ответа анти- (Т,Г)-А--Л
	%а	%б	%а	%б	
404	89	11	68,60	32,40	67
405	62	38	35,30	65,70	79
410	62	38	13,10	87,90	79
423	60	40	47	53	80
424	20	80	31	69	79

Рис. 18. Анализ аллотипов общих сывороточных иммуноглобулинов и специфических анти-(Т, Г)-А--Л антител у аллофенных мышей СЗН ↔ СВВ. Вверху: связывание антигена ^{135}I (Т, Г)-А--Л (в процентах) после стандартной иммунизации мышей — на вертикальной оси. На нижней горизонтальной оси — антитела в аллотипе Ig-1 (γG_{2a}) (отвечающих мышей) в процентах к общему количеству Ig-1. Верхняя горизонтальная ось взаимосвязана с нижней горизонтальной осью и показывает антитела аллотипа Ip-1 (γG_{2a}) (мыши а, неответающие) в процентах к общему количеству Ig-1, имеется определенная корреляция между аллотипом и статусом отвечающих животных (статус отвечающих $\geq 50\%$ связанного антигена). Все мыши с большим количеством отвечающих аллотипов являются отвечающими — ни одна мышь менее чем с 10% отвечающих аллотипов не давала высокого ответа на (Т, Г)-А--Л. Внизу приводятся общие данные об а(неответающих) и б(отвечающих) по специфическим антителам к (Т, Г)-А--Л аллергенных мышей, показанных на верхнем рисунке. Все 5 животных являются отвечающими к (Т, Г)-А--Л и имеют легкоопределяемые антитела к (Т, Г)-А--Л неответающего аллотипа. Данные, представленные на обоих рисунках, получены при выделении на колонке с иммуносорбентом — сефарозой, связанной с анти-а-аллотипом.

животных имело преимущественно «отвечающий» аллотип иммуноглобулинов и отвечало на (Т, Г)-А--Л или преимущественно «неответающий» аллотип иммуноглобулина и не отвечало на (Т, Г)-А--Л (рис. 18). Однако у 7 или 8 животных от 20 до 80% от общего количества иммуноглобулина сыворотки имело «неответающий» аллотип иммуноглобулина и эти животные сильно отвечали на (Т, Г)-А--Л. Из них у 5 животных содержалось

от 50 до 80% иммуноглобулина «неотвечающего» типа и у этих 5 животных легко было обнаружить специфические антитела к (Т, Г)-А--Л, имевшие неотвечающий аллотип иммуноглобулина. Количество специфических антител к (Т, Г)-А--Л «неотвечающего» аллотипа у этих животных значительно больше, чем у интактных неотвечающих животных. Очевидно, это означает, что отвечающие Т-клетки могут взаимодействовать с неотвечающими В-клетками и приводить к образованию специфических антител к (Т, Г)-А--Л. Если мы можем исключить аллогенный эффект, упомянутый Вепасеггаф и Катц, то этот предварительный результат, очевидно, позволяет предположить, что Ig-гены проявляются исключительно в Т-клетках. Прежде чем увериться в этом результате, надо несколько раз повторить определение аллотипа и поставить опыты, так чтобы исключить аллогенный эффект. Даже у этих конгенных животных наблюдается тенденция к образованию большего количества антител отвечающего аллотипа, чем можно было бы предполагать, исходя из соотношения аллотипов во всем сывороточном иммуноглобулине. Например, у животного, у которого 80% от общего сывороточного иммуноглобулина имеет неотвечающий аллотип, только 30% специфических антител к (Т, Г)-А--Л могут иметь «неотвечающий» аллотип иммуноглобулинов, а остальные антитела принадлежат к «отвечающему» типу.

Мы предполагаем что существует весьма реальная причина этому, а именно: отвечающие Т-клетки менее эффективно взаимодействуют с неотвечающими В-клетками через гомозиготный барьер Н-2, чем с отвечающими В-клетками. Иными словами происходят инбредные взаимодействия между Т- и В-клетками одного и того же гаплотипа Н-2. Для того, чтобы проверить эту гипотезу, сейчас мы получаем мышей с гомозиготными различиями по маркерам иммуноглобулинового аллотипа, но лишь с гетерозиготной разницей по Н-2. Если наши предположения правильны, то у этих животных, очевидно, легко будет обнаружить «неотвечающие» антитела к (Т, Г)-А--Л.

Это подтвердит нашу гипотезу, что взаимодействие Т- и В-клеток происходит более эффективно, если отвечающие Т-клетки имеют по крайней мере один общий аллель Н-2 с неотвечающими В-клетками.

Председатель Simonsen. Согласен ли с этим Вепасеггаф?

Вепасеггаф. На этой вступительной сессии мы все еще не уверены в том, обязательно ли проявляются Н-сцепленные Ig-гены в В-клетках? Нет сомнений в том, что они обязательно проявляются в Т-клетках, где выполняют специфическую функцию.

На третьей сессии этой конференции мы услышим о сцепленных с аллотипом Ig-генах, которые контролируют иммуноглобулиновую специфичность и обязательно проявляются в В-клетках. Можно сомневаться в том, что эти сцепленные с аллотипом Ig-гены проявляются также в Т-клетках.

В общем мы имеем две системы специфичностей, каждая из которых обладает собственным генетическим контролем и предпочтительно проявляется в одном классе иммунокомпетентных клеток. Повторяю, что пока мы можем оставить этот вопрос.

Sela. Мне кажется, что можно было бы подойти к этой проблеме, попытавшись установить, обнаруживается ли сцепленный с Н-2 генетический контроль, если используется антиген, ответ на который действительно не зависит от тимуса?

Wagner. Отвечая Sela, я хотел бы подчеркнуть, что мне кажется у нас нет полной уверенности в существовании какого-либо абсолютно «тимус-

независимого» антигена, по крайней мере в отношении синтеза IgG, который в основном и интересует нас при изучении иммунного ответа, сцепленного с H-2.

Cohn. Я хотел бы задать Вепасеггаф следующий вопрос: если бы кто-нибудь доказал, что ответ В-клеток зависит от Ig-гена, изменило бы это вашу точку зрения?

Вепасеггаф. Этот факт уже доказан, таким образом, он ничего не меняет.

Cohn. Следовательно, вы считаете, что было бы бесполезно попытаться доказать, что мутация Ig-гена влияет на В-клетки и в любом случае будете утверждать, что даже на В-клетках существует рецептор, не связанный с иммуноглобулинами и закодированный Ig-1 геном. Так ли это?

Вепасеггаф. Я несколько раз повторял, что теперь в ряде лабораторий получены указания на то, что специфичность В-клеток в некоторых системах может зависеть от Ig-гена, сцепленного с тканевой совместимостью, проявляющегося преимущественно в Т-клетках. Нам нужно решить вопрос, посредством какого механизма достигается результат? Я считаю, что различные возможности были ясно сформулированы в ходе дискуссии на нашей первой сессии.

Raff. Мне кажется, что из этой дискуссии вытекает, что было бы очень важно исследовать клетки, связывающие антиген у отвечающих и не отвечающих животных. Например, было бы интересно установить, могут ли антисыворотки против антигенов гистосовместимости подавлять связывание ГТ или ГА В-клетками у морских свинок (2×13)F₁ и связывают ли не отвечающие тимоциты антигены, «невызывающие ответа», и если это связывание происходит, то как на него могут повлиять анти-H-сыворотки. Поставил ли Green подобные опыты?

Green. Пока нет.

Serpellini. Вместе с Kupkel мы поставили опыт, который, возможно, имеет отношение к вопросу Raff. Антисыворотки против HL-A предупреждают образование так называемых холодных розеток, т. е. типичную реакцию Т-клеток у человека.

Raff. Может быть, Serpellini опишет нам этот опыт.

Serpellini. Как вам известно, от 60 до 70% лимфоцитов периферической человеческой крови связывают бараньи эритроциты даже в отсутствие обнаруживаемых антител к бараньим эритроцитам. Эти розеткообразующие клетки, по данным иммунофлюоресценции, не имеют иммуноглобулиновых рецепторов и, таким образом, рассматриваются как Т-лимфоциты.

В одном опыте, в котором мы обрабатывали лимфоциты четырьмя антисыворотками против HL-A, с которыми они реагируют, а затем промывали их и ставили пробу на образование розеток, связывание бараньих эритроцитов снижалось с 60—70% до 2—5%.

По-видимому, это наблюдение также указывает на то, что H-антигены или близкие им структуры играют особую роль в функционировании поверхности клеток.

В условиях нашего теста образование розеток с бараньими эритроцитами клетками, сенсibilизированными антителами против бараньих эритроцитов и В-клетками (клетки хронического лимфолейкоза), видимо, совершенно не подавляется антисыворотками к HL-A.

Raff. Возможно, например, что Т-клетки распознают антигены гистосовместимости и быть может какие-то другие родственные или неродственные антигены при помощи иного механизма, а не с помощью иммуноглобу-

линовых рецепторов. Напротив, для распознавания Т-клетками гаптенов и различных белковых антигенов требуются рецепторы 7S IgM. Было бы весьма интересно, если бы связывание и ответы Т-клеток на «Н»-антигены и те антигены, которые вызывают ответы, контролируемые «Н»-сцепленными Ig-генами, подавлялись бы только антисыворотками к «Н», а связывание В-клетками и ответы на другие антигены подавлялись бы только антииммуноглобулиновой сывороткой.

Benacerraf. Это предположение уже изучается?

Raff. Да.

McDevitt. Hämmerling, работая в нашей лаборатории, изучал связывание (Т, Г)-А--Л нормальными и иммунизированными селезеночными клетками от отвечающих и неответающих мышей. Ясно, что большинство клеток, связывающих антиген, является В-клетками, и столь же ясно, что антисыворотки против «Н» не тормозят это связывание антигена В-клетками. Значительно менее ясна картина в отношении Т-клеток. В настоящее время она изучается.

Сессия 2

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСА H-2 И ЕЕ СВЯЗЬ С I γ - И MLC-ГЕНАМИ

Двухлокусная модель H-2. Картирование I γ -генов. Картирование MLC-генов. Генетические различия между MLC и HL-A. Взаимозависимость между H-2, I γ и MLC. Выводы в отношении характера продукта I γ -гена.

Предисловие редакторов

На этой сессии прежде всего рассматривается тонкая генетическая структура главного комплекса гистосовместимости (H-2) у мышей. Для того чтобы понять эту дискуссию, необходимо знать номенклатуру H-2 и происхождение рекомбинантов по H-2 хромосомам, которые были использованы для того, чтобы получить большинство экспериментальных данных, приведенных на этой сессии. Мы имеем дело с чрезвычайно сложной генетической областью, пока еще не полностью изученной.

Даже после значительного редактирования отдельными выступавшими и редакторами информация, представленная на этой сессии, читается медленно и с трудом. Эта трудность увеличивается тем, что многие гены, упоминаемые на этой сессии, не имеют официально принятой системы обозначений, так как мы только начинаем знакомиться с этими генами и это знакомство продвигается быстрыми темпами.

Однако редакторы считают целесообразным предупредить читателей и попытаться выяснить некоторые неясности в номенклатуре, которые могут ввести в заблуждение читателя, незнакомого с иммуногенетикой H-2-комплекса.

H-2-комплекс у мышей — это не единый ген, а большой хромосомный участок, включающий не только гены, которые кодируют серологически выявляемые трансплантационные антигены, но и гены, контролирующие различные другие функции.

Согласно современной системе обозначений существуют два разных гена, кодирующие серологически определяемые трансплантационные антигены: H-2K и H-2D, которые представлены на рис. 19, иллюстрирующем выступление Schreffler.

Обозначения H-2K и H-2D относятся к генам, которые присутствуют в любой H-2 хромосоме в одной из нескольких различных аллельных форм. Аллельные формы каждого гена обозначаются цифрой, которая означает особую антигенную специфичность, выявляемую серологическими методами. Данная комбинация пронумерованных антигенных специфичностей для H-2K и H-2D называется гаплотипом H-2. Гаплотип H-2 обозначается прописной надстрочной буквой, например: H-2^a, H-2^b или H-2^k.

Эта система позволяет обозначать гаплотип H-2 данной инбредной линии относительно простыми знаками. К сожалению, многие исследователи по-разному обозначают аллели H-2 разных инбредных линий. Поскольку

H-2 по существу является комбинацией минимум двух генов, они не являются аллелями в истинном смысле слова, а комбинацией аллелей по крайней мере в двух разных локусах. Именно поэтому H-2 аллели рассматриваются как псевдоаллели¹.

Для того чтобы избежать чересчур сложной серии цифр для определенных аллелей локусов H-2K и H-2D была принята вышеупомянутая система обозначений, таким образом данный аллель локуса H-2K или H-2D обозначается надстрочной буквой, такой же как строчная буква, обозначающая гаплотип H-2 данной H-2 хромосомы, несущей определяемый локус H-2K или H-2D. Так, считается, что гаплотип H-2^d состоит из аллелей H-2K^d и H-2D^d. Когда читатель обратится к гаплотипу H-2^a, то неизбежно возникнут неясности. Предполагается, что линии, несущие этот гаплотип, являются рекомбинантами между H-2^k и H-2^d, поэтому принято думать, что они несут H-2K^k в комбинации с аллелем H-2D^d. Еще больше недоразумений может вызвать тот факт, что некоторые рекомбинантные хромосомы H-2, полученные в эксперименте, между H-2K и H-2D обозначаются двойными надстрочными буквами, например H-2^{oh} и H-2^{ol}. В этом случае h и l означают генотип локуса Ss в средней части H-2 комплекса и не имеют ничего общего со специфичностью трансплантационных антигенов. С другой стороны, H-2^{Y-Sg} является H-2^Y рекомбинантной хромосомой, полученной Stimpfling (Sg), и обозначается, таким образом, в отличие от H-2^Y хромосомы, полученной Klein. Это различие важно, так как кроссинговеры, которые привели к образованию двух H-2^Y рекомбинантных хромосом, произошли в разных участках H-2 комплекса. Дело еще больше осложняется тем, что принят ряд условных обозначений линий, иногда отражающих гаплотип H-2, а иногда другие аспекты генетического происхождения данной инбредной линии.

ТАБЛИЦА 21

Возможное строение некоторых рекомбинантных H-2 хромосом

Линия	Рекомбинантная хромосома	Родительская комбинация	Участок H-2 ¹			
			K	I _r	Ss	D
B10·A; IR	h	a/b				
B10·A(2R)			k	k	d	b
B10·A(4R)	h	a/b	k	k	b	b
B10·A(3R)						
B10·A(5R)	i	a/b	b	b	d	d
C3HON	oh	d/k	d	d	d	k
C3H·OL	ol	d/k	d	d	k	k
A·AL	al	d/k	k	k	k	d
A; B10·A	a	d/k	k	k	d	d
A·TL	tl	al/s	s	k	k	d
ATH; B10·S(7R)	th	a/s	s	s	s	d
LQR	y	a/q	q	k	d	d
B10·T(6R)	y-Sg	a/q	q	q	q	d

¹ Вертикальные линии показывают возможный участок, где прошел кроссинговер.

Таким образом, если читатель не будет располагать какой-то сводкой для ориентировки, он совершенно запутается. Для этой цели редакторы (табл. 21) взяли на себя смелость перестроить информацию, содержащуюся

¹ Эта точка зрения является устаревшей — Прим. ред.

в табл. 29 Shreffler, чтобы показать инбредные линии, несущие рекомбинантные H-2 хромосомы, вместе с обозначением хромосом и обозначением происхождения каждого гена в H-2-комплексе более или менее в том порядке и в тех же терминах, как они рассматриваются на этой сессии. Изучить эту таблицу нелегко, и читатель должен освоить по крайней мере обозначения линий, обозначения гаплотипа H-2-рекомбинантной хромосомы и позицию кроссинговера на карте (рис. 19). Пока еще не разработана официальная система обозначений, которая относилась бы пронумерованные серологические антигены специфичности H-2 к локусам H-2K или H-2D, поэтому мы воспользовались старой системой, просто обозначающей определенную антигенную H-2 специфичность как H-2.3 или H-2.33 и т. д. Поскольку эти специфичности ясно показаны на схемах, а также упоминаются в тексте, в них, очевидно, нетрудно будет разобраться.

Читатель столкнется также со значительной сложностью номенклатуры генов иммунного ответа (I γ -генов). Вначале, когда выяснилось, что иммунный ответ на (T, G)-A--L сцеплен с H-2-комплексом и ассоциируется с гаплотипом H-2^b, этот ген был обозначен геном иммунного ответа — I, согласно общепринятой традиции давать генам официальное обозначение, как только они будут обнаружены в определенной группе сцепления. В строгом смысле ген иммунного ответа I, или I γ -I, можно было бы обозначить как I γ -I(T,G)-A--L или I γ -I(T,G)-A--L^{hi}. При этой системе обозначения lo и hi означает низкий (low) и высокий (high) уровень иммунного ответа на (T, G)-A--L.

Пока еще неизвестно, являются ли I γ -гены, ответственные за иммунный ответ на (H, G)-A--L и (F, G)-A--L, просто другими аллельными формами I γ -I(T,G)-A--L или представляют собой другие локусы, поэтому для данного набора генов не принято официальной номенклатуры. Во всей этой дискуссии I γ -I иногда обозначают гены иммунного ответа в целом, а иногда только тот ген или те гены, которые контролируют иммунный ответ на 3 синтетических полипептида, упомянутых в справочнике терминов и определений для первой сессии.

По мере того как были открыты дополнительные гены иммунного ответа, они получили неофициальные обозначения, например: I γ —IgA и I γ —IgG, что означает гены, контролирующие сильный или слабый ответ на а-аллотип миеломных белков IgA и γ G_{2a}.

Как ясно указывает Lieberman, есть довольно много доказательств того, что гены I γ -I отличаются от генов I γ —IgA и I γ —IgG. Пока еще мы не можем построить систему обозначений, которая ясно отражала бы эти различия, так как этот вопрос не полностью решен в прямых опытах.

Председатель McDevitt. При любом обсуждении трансплантационных антигенов мыши и особенно основных трансплантационных антигенов мы должны воздать должное Gorer, Snell и другим, которые первыми начали изучать генетику антигенов гистосовместимости мыши и которые на протяжении многих лет разрабатывали основные методические подходы и выводили инбредные линии, столь расширившие наши представления о количестве и разнообразии трансплантационных антигенов. Эти основоположники и подготовленные и вдохновленные ими последователи продолжают изучать трансплантационные антигены и антигены клеточной поверхности. Их работы доказали существование большого количества различных трансплантационных антигенов, большинство из которых теперь называются малыми или слабыми антигенами гистосовместимости. Продолжающийся анализ главных трансплантационных антигенов выявил чрезвычайно сложную генетическую область в IX группе сцепления мыши, которая, по-види-

тому, состоит из большого количества тесно сцепленных генов, контролирующих различные функции, видимо, сходные между собой и, возможно, отражающие структурную взаимозависимость и отдаленное общее генетическое происхождение.

На этой сессии мы хотим рассмотреть ряд новейших наблюдений, прояснивших проблему строения комплекса H-2 и весьма важных для выявления связи между генетическим контролем иммунного ответа, сцепленного с гистосовместимостью и генами, контролирующими сами антигены гистосовместимости.

Мы отклонимся от обычной организации наших сессий и вместо одного у нас выступят три основных докладчика: каждый опишет новейшие наблюдения, связанные с генетической организацией и функциональным проявлением комплекса H-2. Klein и Shreffler недавно разработали новую модель генетической организации тех участков комплекса H-2 локуса, которые контролируют серологически определяемые H-2 антигены и антигены, ответственные за отторжение трансплантата. Эту модель и допущения, лежащие в ее основе, опишет Shreffler. Существование системы большого количества специфических генов иммунного ответа, сцепленных с гистосовместимостью, указывает на какую-то причинную или функциональную связь, лежащую в основе ассоциации между генами, контролирующими антигены клеточной поверхности, и генами, контролирующими специфические иммунные ответы. Для того чтобы разобраться в этой проблеме, необходимо хорошо знать генетические соотношения между двумя этими типами генов. Я расскажу об исследованиях, проведенных вместе с Klein, Shreffler, Stimpfling и Snell, которые дали довольно ясные представления о позиции по крайней мере одного гена иммунного ответа Ig-1 в комплексе H-2.

Уже довольно давно известно, что наряду с антигенами, обуславливающими отторжение трансплантата, серологически определяемыми H-2 антигенами и специфическим иммунным ответом, комплекс H-2 контролирует также антигены, ответственные за реакцию в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ).

Vach и Klein недавно получили новую интереснейшую информацию о связях между локусами, ответственными за реакцию в СКЛ и другими генами, образующими H-2-комплекс. Об этой информации расскажет Vach.

В общем результаты этих различных, но тесно связанных исследований, позволяют думать, что H-2 комплекс является довольно большим хромосомным участком, включающим большое количество генов, ответственных за серологически определяемые H-2 антигены, антигены тканевой совместимости, специфический иммунный ответ и антигены, вызывающие *in vitro* реакцию СКЛ.

Имеются достаточные основания думать, что многие из этих феноменов функционально связаны. Ввиду этого, естественно, возникает вопрос о наличии между ними и структурной связи. Эти предположения будут рассмотрены в нашей общей дискуссии.

Попросим сейчас Shreffler описать двухгенную модель комплекса H-2. Shreffler. Насколько я понимаю, моя основная обязанность заключается не в том, чтобы привести подробные данные о генетическом картировании в комплексе, а в том, чтобы в общих чертах изложить наши современные представления о тонкой генетической структуре H-2 в качестве основы для анализа данных о картировании генов иммунного ответа и генов, ответственных за реакцию СКЛ.

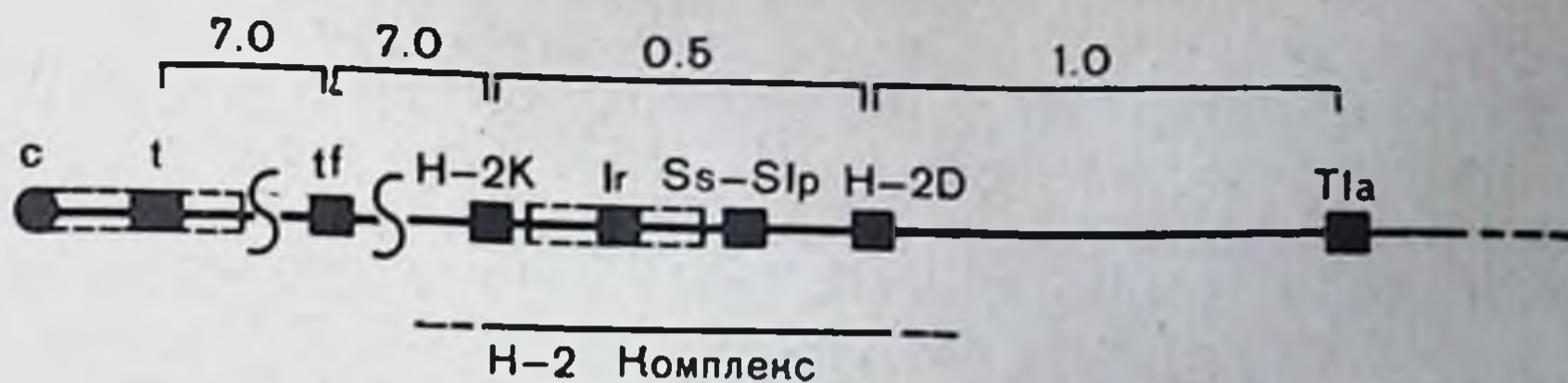


Рис. 19. Хромосома 17 (IX группа сцепления мышей).

На рис. 19 показана наша карта тонкой структуры H-2-комплекса на хромосоме 17 мыши (группа сцепления IX). Те, кто знакомился с литературой по H-2 на протяжении последних лет, должны заметить положение центромеры слева. Вся карта должна быть перевернута по сравнению с прежними вариантами, так как новейшие данные показали, что центромера ближе к концу K комплекса H-2. С комплексом H-2 сцеплен столь же сложный участок близ центромеры и с другой стороны H-2 локус Tla, контролирующий антигены тимусных лейкоцитов и ряд других генов, на которых мы не будем останавливаться. Наши современные представления об H-2-комплексе отличаются от данных, опубликованных за последние 10—15 лет. Теперь мы считаем, что все серологически определяемые специфичности, контролируемые комплексом H-2, детерминируются лишь двумя генетическими областями: H-2K и H-2D. Далее, мы считаем, что участки H-2K и H-2D, вероятно, представлены одиночными генами. Каждый из них контролирует один полипептид, представляющий собой серологически определяемый H-2 антиген. Последнее замечание в основном базируется на химических данных Nathenson и соавт. Далее я поясню, почему мы сейчас предполагаем наличие только двух локусов. Между локусами H-2K и H-2D существуют еще две генетические области. Наиболее знаком всем присутствующим участок Ir, который контролирует по крайней мере часть обсуждаемых нами иммунных ответов, а также, как будет пояснено ниже, участвует в реакции СКЛ.

ТАБЛИЦА 22

Основные свойства системы Ss—Slp мыши.

1. Варианты сывороточных β -глобулинов. Мол. масса 150 000 — 1 000 000
2. Количественные изменения уровня сывороточного белка определяются с помощью кроличьей сыворотки анти-Ss^a. Контролируется аутосомными аллелями. Ssⁿ (высокий уровень), Ss^l (низкий уровень)
3. Структурные (аллотипические) изменения в белке Ss определяются с помощью мышиной сыворотки анти-Slp. Контролируется аутосомным доминантным аллелем Slp^a (положительным для антигена) и рецессивным (отрицательным для антигена)
4. Антиген Slp в норме проявляется у самцов под контролем тестостерона. Индуцируется тестостероном у самок Slp^a
5. Ss и Slp картируются в комплексе H-2. Ss и Slp не разделялись с помощью рекомбинации

Аллель (и)	Относительный уровень Ss	Антиген Slp (у самцов)
Ss ⁿ Slp ^a	20	+
Ss ^h Slp ^o	20	—
Ss ^l Slp ^o	1	—

^a Ss — серологически определяемый сывороточный белок; Slp — белок, проявление которого зависит от пола.

Я уже говорил о том, что длина этого участка I γ не вполне ясна. Как будет сказано позднее, область I γ , вероятно, состоит из ряда различных локусов, находящихся на карте между H-2K и Ss—Slp. В этой связи я могу отметить, что частота рекомбинаций между локусами H-2K и H-2D равна примерно 0,5%. Можно подсчитать число пар оснований ДНК, которые соответствуют этой частоте рекомбинаций, допустив, что частота рекомбинаций в этой области прямо пропорциональна длине ДНК в данном сегменте хромосомы. Мы получаем цифру около 500 тыс. пар оснований, т. е. достаточную примерно для 500 генов с 1000 пар оснований каждой.

Между локусами H-2K и H-2D находится также область Ss—Slp (см. табл. 21). Система Ss—Slp контролирует две функции. Ген Ss контролирует количественные варианты сывороточного β -глобулина, которые выявляются с кроличьей антисывороткой посредством иммунодиффузий. Эти варианты контролируются аллелями Ss^h, определяющими высокий уровень β -глобулина в сыворотке и Ss^l, определяющими низкий уровень белка Ss в сыворотке. Варианты Slp контролируют аллотипы этого белка, что выявляется при помощи аллоиммунных мышинных антител к Slp, которые образуются при иммунизации мышей с одним типом Slp белком Ss от генетически отличающегося типа. Вариации контролируются аутосомным доминантным аллелем, который мы называем Slp^a и который детерминирует присутствие аллотипа, и рецессивным аллелем Slp^o, который детерминирует его отсутствие.

Интересно, что проявление аллотипа Slp ограничено полом: в норме он встречается только у самцов. Проявление его контролируется тестостероном и антиген можно индуцировать у самок с аллелем Slp^a путем введения тестостерона. Ss и Slp занимают на карте область между генами H-2K и H-2D. Этот вывод основан на данных, полученных при изучении 18 рекомбинантов внутри H-2. Пока что функции Ss и Slp не удалось разделить путем рекомбинаций, т. е. создается впечатление, что они контролируются единым генетическим локусом. Однако они могут контролироваться двумя тесно сцепленными локусами и мы будем придерживаться этой точки зрения. Различия Ss—Slp не играют заметной роли в гистосовместимости, как мы установили с помощью пересадок кожи между мышами линий, различающихся только по области Ss—Slp — и не обнаружили отторжения трансплантатов.

Я могу сказать, что если на карте мы обозначаем эти четыре области, то это еще не значит, что мы отрицаем существование большего числа областей, т. е. большего количества генов между H-2K и H-2D. Например, возможно, имеются добавочные локусы, контролирующие антигены, которые можно было бы выявить при пересадке кожи, но которые серологически не определимы или же могут быть гены с неродственными функциями.

ТАБЛИЦА 23

Некоторые антигенные специфичности основных гаплотипов H-2

Хромосома	H-2-специфичности														
	1	2	3	4	5	6	8	—	23	—	—	—	—	35	36
a	1	—	3	4	5	6	8	—	23	—	—	—	—	35	36
b	—	2	—	—	5	6	—	—	—	—	—	—	33	35	36
d	—	—	3	4	—	6	8	—	—	—	31	—	—	35	36
k	1	—	3	—	5	—	8	—	23	—	—	32	—	—	—
q	1	—	3	—	5	6	—	17	—	30	—	—	—	—	—

Наша так называемая двугенная модель комплекса Н-2 сводится лишь к определенной позиции генов, контролирующих серологически выявляемые специфичности.

Теперь я хотел бы рассмотреть генетический контроль серологических специфичностей. В табл. 23 приведена очень простая карта Н-2, где обозначено несколько отобранных типов Н-2 и контролируемые ими антигенные специфичности. Дело в том, что с каждой Н-2 хромосомой или гаплотипом Н-2 ассоциируется ряд различных аллоантигенных специфичностей, которые в большинстве своем выявляются с относительно моноспецифическими антисыворотками в реакции гемагглютинации или в цитотоксических тестах. Как вы знаете, эти наборы специфичностей можно разделить генетической рекомбинацией. Это впервые доказали Gogeg и его соавторы более 15 лет назад.

Согласно предлагаемой двухлокусной модели, мы разделили эти специфичности на две группы: набор Н-2К и набор Н-2D на основе рекомбинаций. В табл. 24 показан для примера тип карты Н-2, которым мы пользу-

ТАБЛИЦА 24
Расположение Н-2-специфичностей по областям

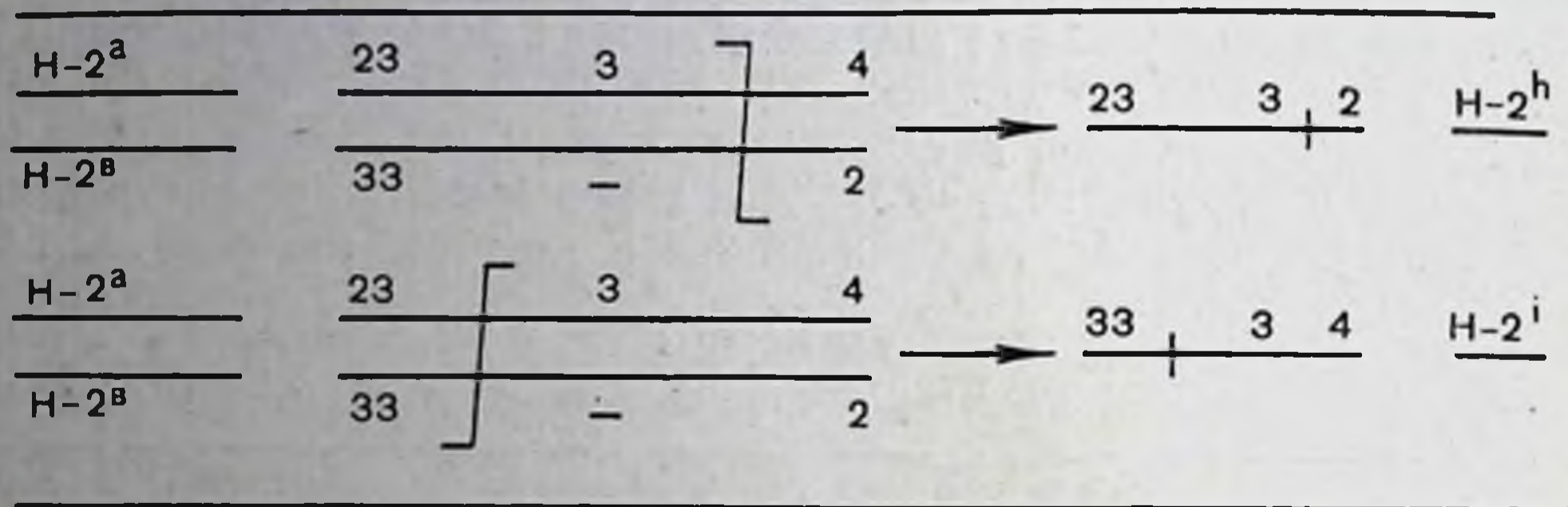
Хромосома	Область Н-2К						Область Н-2D							
	частные	общие					общие					частные		
a	23	1	3	5	8	—	—	—	3	—	6	35	36	4
b	33	—	—	5	—	35	36	—	—	—	6	—	—	2
d	31	—	—	—	8	—	—	—	3	—	6	35	36	4
k	23	1	3	5	8	—	—	1	3	5	—	—	—	32
q	17	1	2	5	—	—	—	?	3	?	6	—	—	30

емся сейчас. Я хочу подчеркнуть две особенности этой карты: первая состоит в том, что каждый локус Н-2К или Н-2D на разных хромосомах характеризуется своей частной специфичностью. Под частной специфичностью я имею в виду специфичность, свойственную исключительно (или почти исключительно) этой хромосоме. Кроме того, в каждом локусе Н-2К или Н-2D существует ряд так называемых общих специфичностей, которые являются общими для многих разных гаплотипов Н-2, например, ряд разных антигенов локуса Н-2К имеют общие специфичности Н-2.1, 3, 5, 6 и т. д. Хромосома Н-2^a почти несомненно является примером рекомбинантной хромосомы, т. е. (одна ее часть) происходит от хромосомы Н-2^k, а другая от хромосомы Н-2^d. Очевидно, рекомбинация произошла у гетерозиготной мыши Н-2^d/Н-2^k между концами К и D комплекса Н-2. Следует заметить, что локус Н-2К гаплотипа Н-2^k идентичен локусу Н-2К гаплотипа Н-2^a, а локус Н-2D гаплотипа Н-2^d идентичен локусу Н-2D гаплотипа Н-2^a. Именно отсюда произошла терминология для генов К и D.

Вторая, главная особенность этой карты с точки зрения новой модели Н-2 комплекса состоит в том, что некоторые специфичности, видимо, имеются в обеих областях, а именно: Н-2.1, 3, 5, 35, 36. Именно это допущение позволило прояснить проблему, которая ранее представлялась очень сложной. В настоящее время мы полагаем, что некоторые общие специфичности могут быть детерминированы локусами Н-2К или Н-2D на разных хромосомах, (например, Н-2.35 в Н-2^b и Н-2^d) или в некоторых случаях обоими генами одной и той же хромосомы (т. е. Н-2.3 в Н-2^a). Иначе говоря, мы считаем,

что антигены, детерминируемые некоторыми аллелями в локусах H-2K и H-2D, могут давать перекрестные серологические реакции и эти перекрестные реакции и являются общими специфичностями. В течение многих лет предполагалось, что в комплексе H-2 существуют не только области K и D, но и области C, V, ε и A. Единственное допущение существования перекрестной реактивности между K—D дало нам возможность отказаться от всех этих участков, так как области C и V и ε и A связаны со специфичностями H-2.1, 3 и 5, которые представлены на карте как перекрестно-реагирующие (обозначены звездочками).

ТАБЛИЦА 25

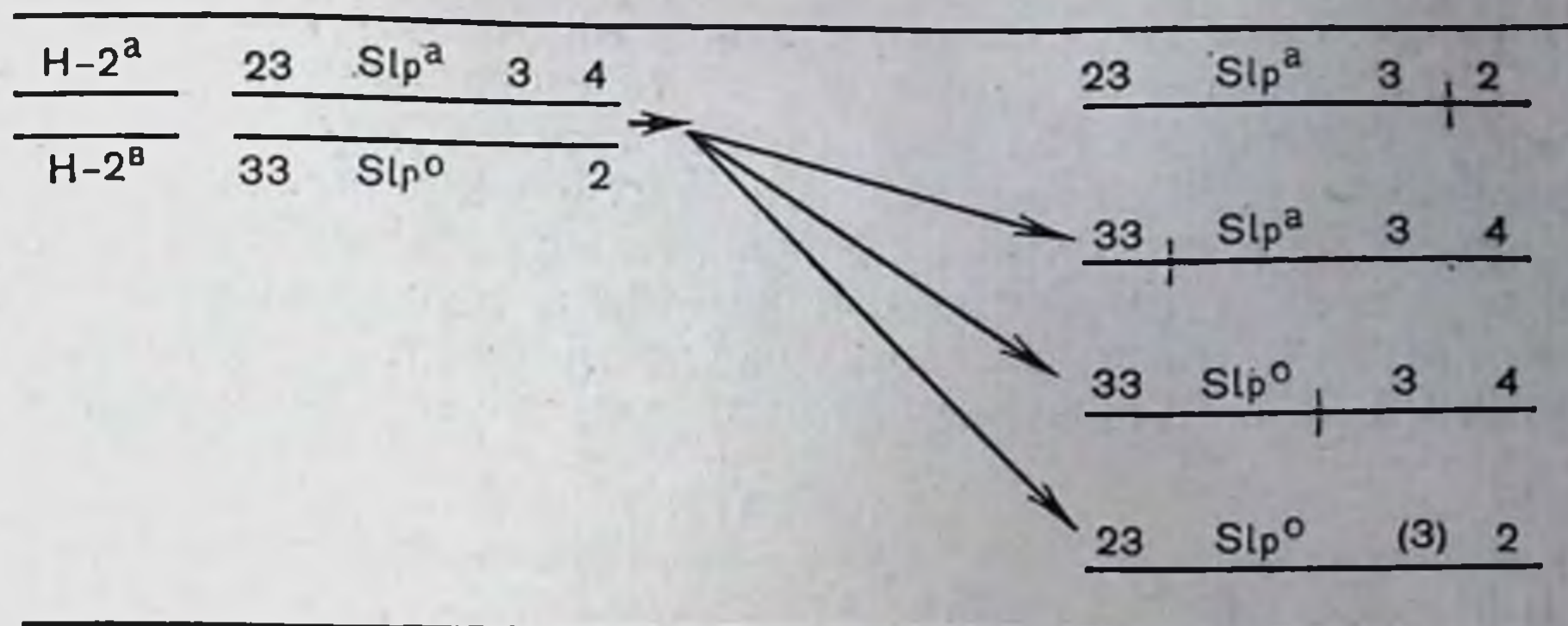


Теперь я хочу вкратце остановиться на данных, которые привели к этой новой концепции. В табл. 25 показаны два первых рекомбинанта, обнаруженные Gogeg с соавт. в 1955 г.: H-2^h и H-2ⁱ, оба они происходят от гетерозигот H-2^a/H-2^b. В табл. 25 я показал только частные специфичности K и частные специфичности D этих двух хромосом. Gogeg и его соавторы установили, что рекомбинанты типа H-2^h имеют частную специфичность H-2.23 от H-2^a, частную специфичность H-2.2 от H-2^b и общую специфичность H-2.3. В то время еще не было известно, что некоторые специфичности являются частными, а другие общими. Выяснилось, что H-2ⁱ имеет прямо противоположные специфичности от H-2^a и H-2^b, т. е. H-2.33 от H-2^b и H-2.4 от H-2^a; опять-таки имелась специфичность H-2.3.

Согласно обычным принципам составления генетической карты для трех признаков был сделан вывод, что принимая, что каждый из этих двух типов рекомбинантов происходит от одного кроссинговера, специфичность 3 должна находиться в середине карты H-2, чтобы можно было изобразить два найденных рекомбинанта. В то время это рассуждение представлялось достаточно логичным. Позднее Stimpfling подтвердил наблюдение Gogeg в отношении рекомбинантов H-2^h и H-2ⁱ. Он обнаружил семь рекомбинантов типа H-2^h и H-2ⁱ и опять-таки выявил то же разделение специфичностей K и D. Stimpfling заметил также, что все рекомбинанты, найденные для этой гетерозиготной комбинации H-2^a/H-2^b, содержат H-2.3, хотя, если эта карта верна, можно было бы ожидать одинаковое количество рекомбинантов, имеющих H-2.3 и без H-2.3. Однако рекомбинант, не имеющий H-2.3, не был найден. В табл. 26 показано еще одно осложнение, относящееся к этой карте, которое возникло, когда рекомбинанты H-2^h и H-2^a были типированы по Slp. Выяснилось, что рекомбинантов H-2^h и H-2ⁱ можно было разделить на два типа: один Slp-положительный и другой Slp-отрицательный.

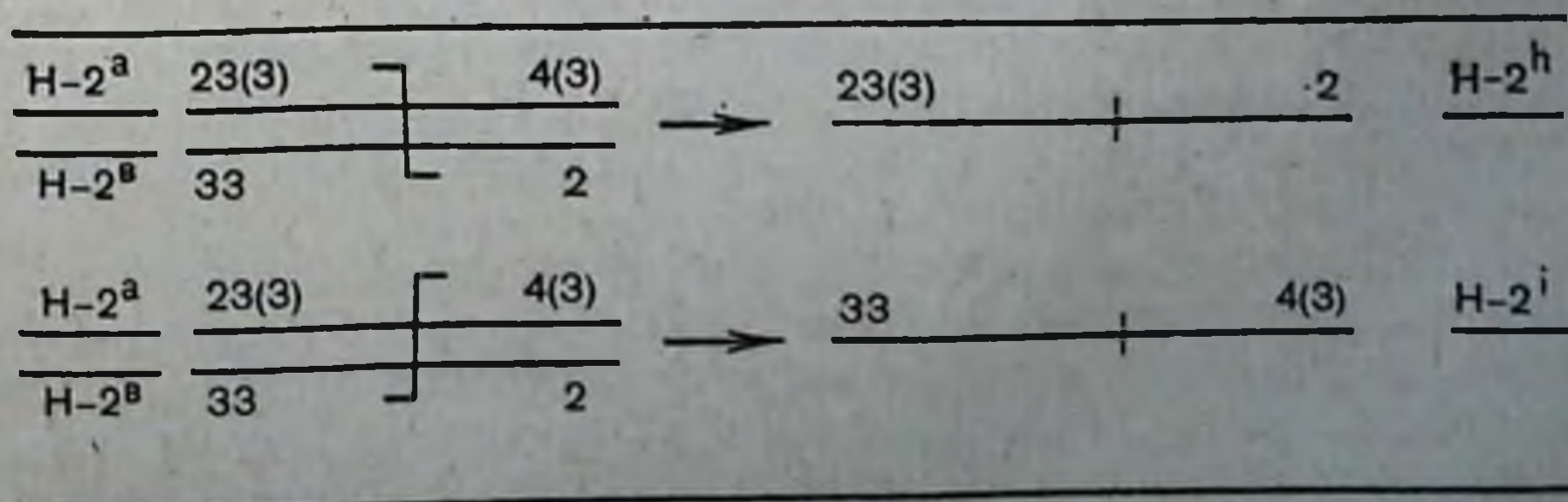
Как уже говорилось, данные, указывающие на локализацию Slp между K и D, довольно убедительны, но, когда мы попытались картировать Slp по отношению к H-2.3, мы встретились с трудностями. Согласно старой карте

ТАБЛИЦА 26



с порядком 23, Slp^a 3, 4 для галлотипа H-2^a можно объяснить первые три из этих четырех типов рекомбинантов единственным кроссигвером, но для четвертого типа следует предположить тройной кроссингвер. Если попытаться локализовать H-2.3 по другую сторону от Slp^a, то возникает та же проблема с третьим рекомбинантом. Действительно, где бы не поместить H-2.3, следует допустить либо тройной кроссингвер, либо то, что карта неверна. Конечно, можно было бы предположить, что один тройной кроссингвер имел место и что это объяснение наиболее логично. Однако для некоторых рекомбинантов, описанных в других работах, имеются свои трудности со специфичностью 3. Мы встретились также с трудностями такого же рода в отношении специфичности 1, специфичности 5, и в полученных позднее данных Spell и соавт. — со специфичностями 35 и 36. Опять-таки мы не смогли расположить эти специфичности каким-то закономерным образом, если допустить, что рекомбинанты происходили в результате одинарного кроссингвера. Ввиду этого у нас возникло предположение, что возможно некоторые общие специфичности, как например H-2.3, каким-то образом отражали перекрестную реактивность между весьма сходными антигенными продуктами H-2D и H-2K. В табл. 27 приведено объяснение в отношении кроссингверов H-2^a/H-2^b. Если допустить, что специфичность H-2.3 может детерминироваться и концом K и концом D комплекса H-2, то ясно, что кроссингвер в любом месте и в любом направлении между K и D даст рекомбинант, содержащий H-2.3. Если H-2.3 очень тесно сцеплена с H-2.23 в одном конце и с H-2.4 в другом конце, то рекомбинации между этими специфичностями быть не должно. Конечно, можно допустить, что H-2.23 и H-2.3 детерминируются разными мутантными участками одного гена и что иногда происходит внутригенная рекомбинация, но, очевидно, частота ее должна быть значительно ниже наблюдаемой.

ТАБЛИЦА 27



Таким образом, можно объяснить и отсутствие рекомбинантов, не содержащих Н-2.3. Табл. 28 показывает, как можно решить проблему локализации Н-2.3 по отношению к маркеру Slp в середине комплекса. Четыре разных типа рекомбинантов получаются очень просто в результате двух реципрокных обменов в двух участках между К и Slp и между Slp и D. Я не хочу тратить время на многочисленные дополнительные данные и просто скажу, что все трудности устраняются, если рассуждать таким же образом и в отношении других проблем, связанных со специфичностью 3, а также специфичностями 1 и 5. Таким же образом, пока двухгенная модель еще не

ТАБЛИЦА 28

Н-2 ^a	23(3)	Slp ^a	4(3)	→	23(3)	Slp ^a	2
Н-2 ^b	33	Slp ^o	2	→	33	Slp ^a	4(3)
				→	33	Slp ^o	4(3)
				→	23(3)	Slp ^o	2

доказана, но она соответствует всем имеющимся данным и позволяет обойти многие имеющиеся ранее трудности.

Benacerraf. В данном случае считает ли Shreffler, что общие специфичности кодируются молекулами концов К и D в этом комплексе или молекулами, которые кодируются генами вне комплекса Н-2.

Shreffler. Если я правильно понял Benacerraf, он спрашивает, является ли участок Н-2К одним локусом, как я сказал, или комплексом генов, из которых часть детерминирует Н-2.23, а другие — Н-2.3 и т. д.

Benacerraf. Да, вы меня поняли правильно.

Shreffler. Мы полагаем, что участок Н-2К — это один локус, так как согласно химическим данным, специфичности Н-2.3 и Н-2.4, к примеру, присутствуют на одной и той же молекуле. Не все общественные специфичности были исследованы по отношению к частным специфичностям этой методикой, но в исследованных случаях общая специфичность преципитировалась антисывороткой против частной специфичности и обратно. Это указывает на то, что общие и частные специфичности находятся на одних и тех же молекулах. С другой стороны, думаю, что было бы преждевременным отрицать возможность существования других локусов в комплексе, детерминирующих родственные антигены, которые мы не нашли серологически.

Benacerraf. Следовательно, по мнению Shreffler, они могут кодироваться отдельно, и все же проявляться на одной и той же молекуле.

Shreffler. Да, это так. Ведь первоначально именно этим предположением Stimpfling объяснил невозможность найти Н-2.3-отрицательных рекомбинантов, а именно тем, что специфичности Н-2.3 или молекула Н-2.3, если хотите, почему-то необходимы для проявления частной специфичности Н-2.4 или Н-2.23. Это не исключено.

В основе двухлокусной модели лежит допущение о перекрестной реактивности между продуктами Н-2К и Н-2D, т. е. какая-то антисыворотка, которую в данном случае мы называем антисывороткой против Н-2.3, может реагировать, например, и с продуктом К и с продуктом D гаплотипа Н-2^a. В соответствующей таблице показано, каким образом мы пытались прове-

ритель это допущение о существовании перекрестной реактивности между двумя областями. В нашем изображении рекомбинантов H-2^h и H-2ⁱ, как вы видите, специфичность H-2.3 должна быть связана с областью K в H-2^h и с областью D в H-2ⁱ. Данные Snell, Demant и Chergu позволяли предположить наличие какой-то серии специфичностей, сходных с H-2.33 в обеих областях. Однако их антисыворотки, возможно, содержали другие антитела, помимо антител против H-2.3. Мы избежали этой трудности, иммунизируя родителей тканью от одного рекомбинанта и затем типирова антисывороткой против другого рекомбинанта. Так, если мы иммунизируем животных H-2^b тканью от рекомбинанта H-2ⁱ, мы получаем антисыворотку, которая может реагировать только с областью гаплотипа H-2ⁱ. Если эта антисыворотка реагирует с клетками рекомбинанта H-2^h, то, очевидно, существует перекрестная реактивность между областью H в H-2^h и областью D в H-2ⁱ. Эту реактивность невозможно объяснить каким-то промежуточным перекрывающим участком, так как проверка показала, что это реципрокные рекомбинанты. Предварительные выводы из данных, полученных этим методом, заключаются в том, что области D и K обладают способностью к перекрестным реакциям.

Другой метод, слишком сложный для того, чтобы я мог его здесь подробно описать, был использован Klein с моим участием. Мы пользовались кожными трансплантатами, чтобы обнаружить возможные срединные участки, контролируемые H-2-антигенами. Эти данные были только что опубликованы («J. Exp. Med.», 1972, v. 135, p. 924), поэтому я не буду подробно останавливаться на деталях. Эти данные не указывают на присутствие центральных областей между K и D, кодирующих антигены, которые можно обнаружить при пересадках кожи. Таким образом, на данном этапе все имеющиеся сведения соответствуют предположению, что существуют только два локуса или области H-2K и H-2D, контролируемых серологически определяемые трансплантационные H-2-антигены. Однако я считаю, что не исключена возможность, что с помощью новых рекомбинантов или дру-

ТАБЛИЦА 29

Возможное строение некоторых рекомбинантных H-2-хромосом^a

Родительская комбинация	Рекомбинантная хромосома	Регион H-2				Тип линии (H)
		k	Ir	Ss	D	
d/k	oh	d	d	d k	C3H.OH	
d/k	ol	d	d	kk	C3H.OL	
d/k	al	k	k	k d	A.AL	
d/k	a	k	k	dd	A; B10.A	
a/b	h—2Sg	k	k	d b	B10.A (2R)	
a/b	h—3Sg	k	k	bb	B10.A (4R)	
a/b	i—2Sg	b	b	dd	B10.A (5R)	
a/b	i—Go	b	b	bd	HTI	
d/b	g	d	d	d b	HTG	
k/q	m	k	k	k q	B10.AKM	
a/s	th	s	s	s d	A.TH; B10. S (7R)	
al/s	tl	s	k	kd	A.TL	
a/q	y	q	k	dd	AQR	
a/q	y—Sg	q	q	q d	B10.T (6R)	

^a Вертикальные линии показывают возможный участок, где прошел кроссинговер.

гих методов выявления антигенных различий могут быть обнаружены новые локусы.

Табл. 29 должна послужить как бы дорожной картой для изучения иммунного ответа и данных по составлению карт СКЛ, которые будут изложены позднее. В этой таблице я перечислил всех рекомбинантов, о которых пойдет речь. Надо сделать несколько замечаний об этих рекомбинантах. Во-первых, в левом столбце перечислены родительские гетерозиготные комбинации, от которых получены рекомбинанты. В следующем столбце указаны условные обозначения хромосом или гаплотипов. Затем под обозначениями областей K, I γ , Ss и D я привел генетическую информацию, которую несет каждая область, согласно новой модели. Например, возьмем случай вверху: H-2^{oh} имеет аллель (или наборы аллелей) H-2^d в областях K, I γ и Ss, но локус H-2D имеет аллель или аллели хромосомы H-2^k. В последнем столбце указаны различные типы линий для каждого из этих рекомбинантов.

Теперь я хотел бы отметить некоторые сопоставления, которые можно сделать, пользуясь этими рекомбинантными линиями. Например, ранее я указывал, что с областью Ss не связано отторжение кожных трансплантатов. Если обменять кожу линий C3H.OH и C3H.OL, то, поскольку они идентичны по областям K, I γ и D и отличаются друг от друга только по Ss, это будет значить, что мы исследуем различия гистосовместимости, связанные с областью Ss. Точно так же, если сопоставить тип H-2^{oh} с типом H-2^d, то очевидно мы будем рассматривать различие, ограниченное областью D.

Наконец, мне хотелось бы отметить две очень интересные комбинации линии ATH—ATL и AQR—B10.T (6R), которые будут обсуждаться ниже с точки зрения карты I γ и MLC. Эти две пары линий идентичны серологически, согласно всем имеющимся данным — идентичны по области K и идентичны по области D, но различаются по областям I γ и Ss и, как будет сказано далее, они оказались решающими при локализации генов, контролирующих I γ и MLC. Так или иначе, при подобных сопоставлениях можно определить роль каждой отдельной области в различных тестах: пересадке кожи, серологических тестах СКЛ, РТПХ и иммунном ответе. Думаю, что эти рекомбинанты в дальнейшем станут еще более ценными для изучения генетического контроля иммунного ответа.

Председатель McDevitt. Далее ограничимся только обсуждением специфических вопросов по новой трактовке H-2.

Bodmer. Я хочу задать вопрос Shreffler о характере общих антигенов, который важен для сопоставления H-2 и HL-A. Какая часть общих антигенов вступает в перекрестную реакцию между концами D и K и какая часть их дает перекрестные реакции только среди антигенов K или D?

Shreffler. Для того чтобы придерживаться двухгенной модели, мы должны были бы приписывать специфичности 1, 3, 5, 35 и 36 обеим областям в различных комбинациях. Таким образом остается около 10—12 общих специфичностей, которые пока отнесены только к тому или другому концу.

Allison. Может быть, существование общих антигенов можно было бы объяснить просто тем, что гены H-2D и H-2K образовались вследствие дубликации гена-предшественника на какой-то пройденной стадии процесса эволюции и что общие гены представляют собой сохранившиеся последовательности аминокислот, а другие антигены являются последовательностями, которые образовались в дальнейшем, в результате мутаций.

Shreffler. Полагаю, что Allison предложил прекрасное объяснение. Я объяснил бы это совершенно таким же образом.

Lilly. С этой проблемой редупликации связано то, что мне представляется величайшей тайной комплекса H-2 и, очевидно, эквивалентных сложных комплексов у других видов. Если допустить, что H-2K и H-2D образовались в результате дупликации генов, то возникает вопрос: почему они остались вместе на протяжении многих тысячелетий, тысяч поколений в процессе эволюции? Может ли Shreffler что-нибудь сказать об этом? Альфа- и бета-локусы в системе гемоглобина очевидно образовались таким же образом и разделились между разными хромосомами в дальнейшем ходе эволюции. В системе H-2 у мышей эти два гена образовались согласно гипотезе в результате редубликации; они стали разобобщенными значительным количеством нуклеиновой кислоты и все же остались вместе. Есть некоторые основания полагать, что это относится и к другим видам.

Shreffler. Я согласен с Lilly, что возможно существует какая-то сила, которая их удерживает вместе. Можно было бы предположить какой-то вид селекции, действующий на длинном (супергенном) участке хромосомы.

Sela. Хочу внести некоторое уточнение. Когда Shreffler пользуется термином «антиген», имеет ли он в виду антигенные молекулы, или антигенные детерминанты, возможно, на одной и той же молекуле? Существует ли разница между двумя антигенными детерминантами, когда они находятся на одной и той же молекуле или когда они находятся на разных молекулах?

Shreffler. Sela совершенно прав. Я должен признать, что иногда неправильно пользуюсь словом антиген, когда я имею в виду специфичность или детерминанту. Но мне кажется, что их определения достаточно ясны. Я рассматриваю H-2 антигены как один полипептидный продукт, вероятно имеющий ряд специфичностей. Однако мы не знаем, отражают ли эти множественные специфичности одну детерминантную группу, которая реагирует по-разному с разными популяциями антител, или множественные детерминантные группы. Мне кажется, что пока у нас нет данных для того, чтобы избрать одно из этих предположений.

Grumet. Может ли Shreffler сказать нам, меняется ли в значительной степени частота кроссинговера в зависимости от таких факторов, как разный генетический фон или разные аллели H-2? У меня сложилось впечатление, что частота кроссинговера сильно варьирует, причем в некоторых комбинациях линий кроссинговер происходит очень редко, а в других комбинациях часто.

Shreffler. Да, это, по-видимому, так. Комбинация H-2^a/H-2^b дают частоту рекомбинаций порядка 0,5%. Это примерно средняя частота для всех комбинаций. Согласно имеющимся данным, в комбинации H-2^d/H-2^k частота рекомбинаций скорее приближается к 0,2%. С другой стороны, в комбинации H-2^d/H-2^b частота равна примерно 1,5%. Однако дело в том, что средняя ошибка для этих цифр столь же велика, как и сама частота. В результате статистической достоверной разницы между частотами нет. Мы можем лишь сказать, что есть некоторые основания предполагать, что разница существует.

Grumet. Может ли Shreffler назвать нам комбинации, при которых кроссинговер очень редок?

Shreffler. Да. Stimpfling и я довольно детально изучили комбинацию H-2^b/H-2^k, но не нашли рекомбинантов. Однако Atmos недавно нашел одного рекомбинанта в относительно небольшой выборке. Таким образом это дело случая.

Venacerraf. Известно, что антигены H-2 проявляются в разной степени на разных типах клеток. Можно ли утверждать, что частные специфичности и общие специфичности проявляются параллельно на всех клетках в одина-

ковой степени? Есть ли у Shreffler данные, характеризующие проявления частных и общих специфичностей на лимфоцитах?

Shreffler. Был проведен ряд исследований по распределению в тканях различных отдельных H-2 специфичностей. Эти исследования были осуществлены прежде, чем стала известна разница между частными и общими специфичностями, но иногда применялись довольно хорошие антисыворотки. В общем был сделан вывод, что разные специфичности конкордантно представлены в различных тканях, иными словами, относительные уровни общих и частных специфичностей сопоставимы в разных тканях, хотя общий уровень антигенов H-2 в разных тканях может широко колебаться.

Bodmer. Существует ли разница между полами по частоте рекомбинаций?

Shreffler. Согласно данным Stimpfling, частота рекомбинаций больше у самок. Часть моих собственных данных не выявила особой разницы. Возможно, что разница существует, но по общей средней частоте она вряд ли весьма значительна.

Herzenberg. Есть ли указания на перекрестные реакции между изолированными белками областей D и K, которые, как я понял, разобщены?

Shreffler. Пока мы не исследовали этого вопроса, но надеюсь, что вскоре он будет исследован.

Herzenberg. Между изолированным белками H-2 и Ss перекрестной реакции нет. Согласен ли Shreffler, что Ss не имеет ничего общего с H-2, за исключением того, что они расположены по соседству?

Shreffler. Это правильно.

Herzenberg. То же может относиться и к I γ , т. е. он не имеет ничего общего с H-2, за исключением того, что случайно находится поблизости.

Shreffler. Я не знаю никаких указаний на прямые связи I γ с определенным серологически H-2-антигеном.

Председатель McDevitt. Было бы целесообразно, если б я перечислил здесь данные против этого?

Herzenberg. Если это даст что-то новое, то да.

Председатель McDevitt. На основании исследования многих различных линий и многих рекомбинантов по H-2 в работе Grumet ген I γ -1 можно отделить от генов, детерминирующих серологическую специфичность H-2, т. е. ответы I γ -1, видимо, не связаны специфически с какими-то определенными специфичностями H-2.

Allison. Существуют рекомбинанты, в которых гены I γ и H-2 разделены, поэтому один из первоначальных доводов, поддерживающих мнение, что белки H-2 и продукты I γ -гена представляют собой одно и то же, отчасти опровергнут. Это надо было учитывать при обсуждении триады упомянутой Simonsen на сессии 1.

Shreffler. Один из опытов, который мне безусловно следует поставить, должен заключаться в обмене трансплантатами между линиями A.TH и A.TL, которые различаются только по участкам I γ и Ss, чтобы установить, влияют ли I γ -гены на выживаемость трансплантатов. Пока еще мы этого не знаем, но надеюсь, что скоро узнаем ответ.

Simonsen. Я не понимаю смысла замечания Allison. Серологически идентифицированные антигены могут находиться на тех же молекулах, что и еще не идентифицированные продукты I γ -генов, и то, что мы теперь называем I γ -продуктами, вполне возможно, несут также антигены гистосовместимости.

Председатель McDevitt. Теперь мы можем перейти ко второй части сессии. Здесь мы рассмотрим генетическую связь между специфическими гена-

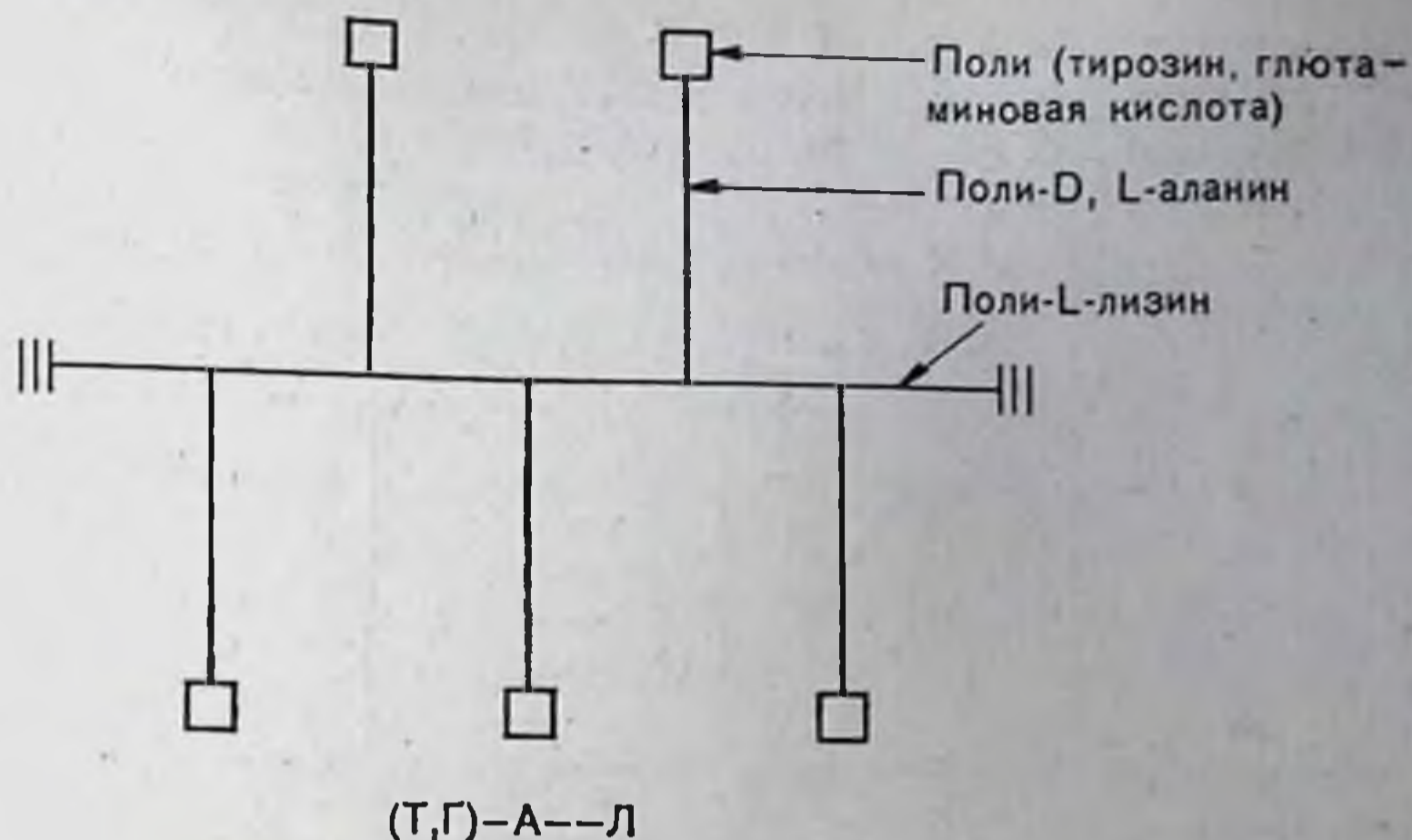


Рис. 20. Схема структуры (Т, Г)-А--Л.

ми иммунного ответа, сцепленными с локусами гистосовместимости, и генами, контролирующими сами антигены гистосовместимости. Ясно, что гены иммунного ответа существуют для большого количества специфических антигенов и специфических антигенных детерминант по крайней мере у трех видов животных: у мышей, крыс и морских свинок. Как доказал Вепасеггаф на сессии 1, основные свойства этого типа генетического контроля специфического иммунного ответа в тех случаях, в которых они были изучены, видимо, одинаковы для всех H-сцепленных генов специфического иммунного ответа, найденных у этих трех видов.

Генетическую карту можно составлять только у мышей. Я расскажу здесь о наших исследованиях, благодаря которым ген иммунного ответа Ig-1 был занесен на карту комплекса H-2. Ig-1 — это ген или гены, контролирующие иммунный ответ на родственный ряд разветвленных синтетических полипептидных антигенов: поли-L-(Т, Г)-поли-D, L-А--поли-L-Л- [(Т, Г)-А--Л]; поли-L(Н, Г)-поли D, L-А--поли-L-Л [(Н, Г)-А--Л]; поли-L (Ф, Г)-поли-D, L-А--поли-L-Л [(Ф, Г)-А--Л]. Рис. 20 представляет собой схему структуры (Т, Г)-А--Л. Здесь показаны поли-L-лизиновый остов, D, L-аланиновые боковые цепочки и аминотерминальные группы тирозина и глутаминовой кислоты в смешанной случайной последовательности. В родственных антигенах этого же ряда тирозин замещен гистидином или фенилаланином. Они перечислены в табл. 30. Все эти синтетические полипептиды антигенны для некоторых линий мышей. Они не дают перекрестной иммунизации, хотя антитела против них вступают в перекрестные реакции. Пользуясь этими тремя антигенами, мы изучили большое количество инбредных линий мышей с рядом различных аллелей H-2.

ТАБЛИЦА 30

Структурные гомологи (Т, Г)-А--Л

Антигенная детерминанта (концевые участки цепи)	Сокращение
Тирозин, глутаминовая кислота	(Т, Г)-А--Л
Гистидин, глутаминовая кислота	(Н, Г)-А--Л
Фенилаланин, глутаминовая кислота	(Ф, Г)-А--ЛЛ

ТАБЛИЦА 31

Ответ инбредных линий мышей, сгруппированных по Н-2 типу, на ряд синтетических полипептидных антигенов

Н-2 тип	Ответ антител на:		
	(Т, Г)-А--Л	(Н, Г)-А--Л	(Ф, Г)-А--Л
a	Низкий	Высокий	Высокий
b	Высокий	Низкий	»
d	Средний	Средний	»
k	Низкий	Высокий	»
q	»	Низкий	»
s	»	»	Низкий

Результаты, приведенные в табл. 31, показали, что ответ данной инбредной линии мышей можно предсказать по ее типу Н-2 и что в инбредных популяциях мышей каждый определенный тип Н-2 имеет определенный тип иммунного ответа на эти три родственных и перекрестно-реагирующих антигена. Например, все инбредные линии мышей, несущие аллель Н-2^a, слабо отвечают на (Т, Г)-А--Л, сильно отвечают на (Н, Г)-А--Л и сильно отвечают на (Ф, Г)-А--Л. С другой стороны, все линии, несущие аллель Н-2^b, сильно отвечают на (Т, Г)-А--Л, слабо отвечают на (Н, Г)-А--Л и сильно отвечают на (Ф, Г)-А--Л. Эту характеристику определенного аллеля Н-2 по его иммунному ответу на эти три антигена можно назвать типом иммунного ответа. Таким образом, можно типировать неизвестную линию или линию, несущую рекомбинантную хромосому Н-2, чтобы установить фенотип ее иммунного ответа. Эти данные приведены в табл. 31, где просто перечислены типы иммунных ответов всех инбредных линий мышей, несущих наиболее распространенные аллели Н-2, а именно: Н-2^{a,b,d,k,q,s}. Как видно из табл. 31, Н-2^a и Н-2^k имеют один и тот же тип иммунного ответа к этим трем антигенам, тогда как все остальные исследованные аллели Н-2 имеют иные типы. Следует также отметить, что под контролем генов иммунного ответа, сцепленных с Н-2, находится ответ на многие другие антигены и что для большинства этих антигенов тип реагирующих и не реагирующих Н-2 аллелей иной, чем указанные в табл. 31, и присущ только одному антигену из тех антигенов, которые находятся под генетическим контролем этого рода. Возможно, что подобная картина может быть следствием существования единственного гена с очень большим количеством разных аллелей, но значительно более вероятно, что существует большое количество тесно сцепленных генов, каждый из которых контролирует ответ на данную антиген-

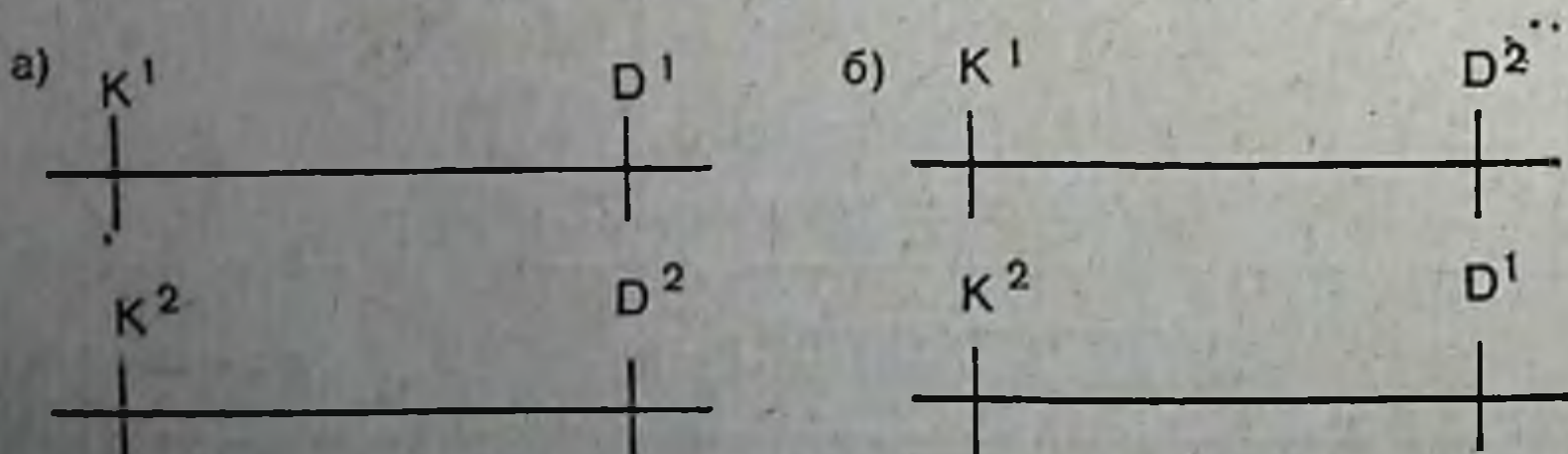


Рис. 21. Рекомбинации между К и D локусами Н-2 комплекса.
а — исходные линии; б — рекомбинанты.

ную детерминанту. Имеются более конкретные данные по этому вопросу, к которым я вернусь позднее.

Главное в табл. 31 — это метод, посредством которого данную инбредную линию можно типировать по гену Ig-1, локусу или локусам, контролирующим ответ на эти три разветвленных синтетических полипептидных антигена. Конечно, этот метод может быть применен для типирования любой линии или группы животных, достаточно инбредных, чтобы быть гомозиготными по IX группе сцепления. Таким методом мы пользовались для определения генотипов Ig-1 многих рекомбинантных хромосом H-2, подробно описанных Shreffler в начале этой сессии. Принцип довольно простой. Например, возьмем две линии, обе гомозиготные, одна несет один тип H-2.1, а другая второй тип H-2.2. Их можно схематически изобразить следующим образом (рис. 21, а).

Поиск кроссинговеров между локусами K и D в H-2 может выявить два типа рекомбинантов, которые можно представить следующей схемой (рис. 21, б).

Когда эти рекомбинанты обнаружены и проверены путем тестирования потомства, можно скрестить 2 животных от возвратного скрещивания, каждый из которых несет рекомбинантную хромосому H-2, чтобы получить линию мышей, гомозиготных по новой рекомбинантной H-2 хромосоме. Затем эти животные получают новое название, как указал ранее Shreffler (см. табл. 29), или эти рекомбинантные по H-2 линии можно типировать по характеру иммунного ответа на три родственных синтетических полипептидных антигена и отсюда установить их генотип по локусу или локусам Ig-1.

Известно, что кроссинговер, который привел к образованию рекомбинантной H-2 хромосомы, произошел между локусами K и D, поэтому мы можем установить, связаны ли гены Ig-1 с локусом K или с локусом D, кроме того, локус Ss находится в центральной части комплекса H-2, поэтому можно определить позицию первоначального кроссинговера по отношению к локусу Ss, как и к локусам K и D.

Мы провели типирование иммунного ответа, т. е. типирование Ig-1 в 11 инбредных линиях, несущих рекомбинантные хромосомы H-2. Если допустить, что Klein и Shreffler правы и что области K и D в H-2 являются в действительности двумя генами, я хотел бы сейчас представить данные, которыми мы располагаем по генотипам Ig-1 этих рекомбинантных хромосом H-2. Если Ig-1 тесно связан с H-2K или расположен где-то в группе сцепления слева от H-2K, то рекомбинантные линии H-2 должны дать тип иммунного ответа, подобный типу донора части H-2K новой хромосомы H-2. С другой стороны, если Ig-1 тесно связан с H-2D или лежит где-то справа от локуса H-2D, то рекомбинантные линии H-2 должны дать тип иммунного ответа, идентичный типу донора локуса H-2D в новой хромосоме H-2.

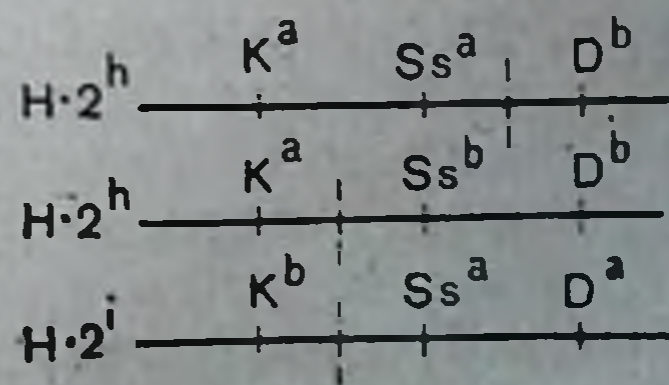
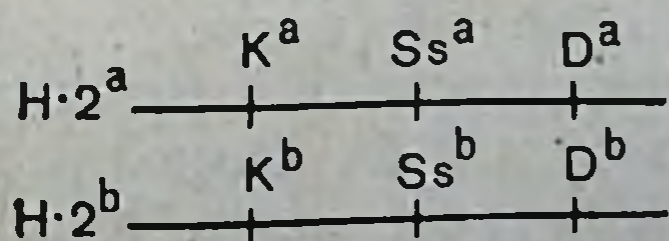


Рис. 22. Упрощенная схема комплекса H-2—H-2^a и H-2^b гаплотипы.

Рис. 23. Схема рекомбинантных H-2 хромосом, образовавшихся в результате кроссинговера между H-2^a и H-2^b гаплотипами.

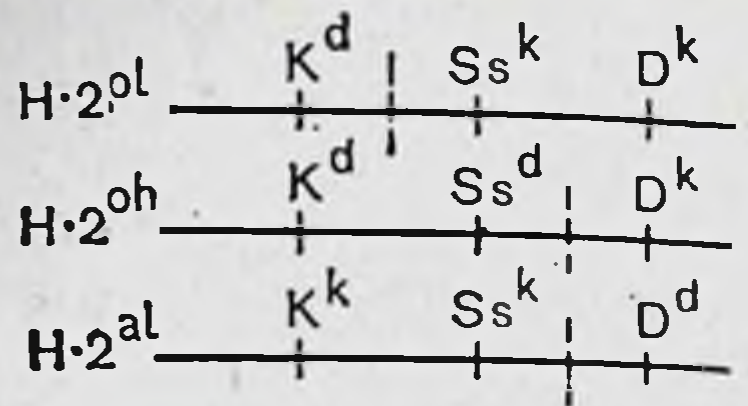
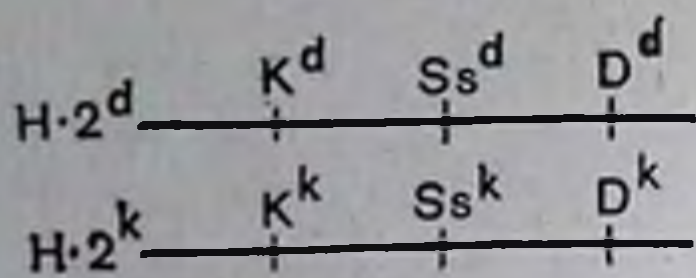


Рис. 24. Упрощенная схема гаплотипов $H-2^d$ и $H-2^k$ $H-2$ -комплекса.

Рис. 25. Схема рекомбинантной хромосомы $H-2$, образовавшейся путем кроссинговера между $H-2^d$ и $H-2^k$.

Я взял на себя смелость еще более упростить схему комплекса $H-2$, представленную Shreffler. На рис. 22 показана схема аллелей $H-2^a$ и $H-2^b$. Я обозначил локусы K , Ss и D в $H-2^a$ как K^a , Ss^a и D^a для ясности, хотя это не совпадает с общепринятой номенклатурой, показанной в табл. 29. Stimpfling выявил и изолировал 5 разных рекомбинантных $H-2$ хромосом, полученных от кроссоверов между $H-2^a$ и $H-2^b$. Эти рекомбинантные хромосомы трех разных типов представлены на рис. 23. Существуют две хромосомы $H-2^b$, каждая из них несет локус K от $H-2^a$ и локус D от $H-2^b$. Они отличаются друг от друга тем, что в одной хромосоме кроссинговер произошел справа от Ss , а в другой слева от Ss . Третий тип рекомбинанта, $H-2^i$, является реципрокным и несет локус K от $H-2^b$ и локус D от $H-2^a$. Все 5 эти рекомбинантные по $H-2$ инбредные линии при иммунизации (Т, Г)-А--Л и (Н, Г)-А--Л дают тот же тип иммунного ответа как донор локуса K рекомбинантной хромосомы $H-2$. Это означает, что $Ig-1$ либо идентичен с локусом K , либо находится очень близко к нему с правой стороны, либо же может лежать в любой точке слева от локуса K .

Располагая этой информацией, мы тестировали вторую группу рекомбинантных инбредных линий $H-2$, полученных при кроссинговерах между $H-2^d$ и $H-2^k$ Shreffler. Родительские аллели $H-2$ указаны на рис. 24, опять-таки согласно моей упрощенной терминологии, а рекомбинантные хромосомы $H-2$, полученные от них, и вероятное место кроссинговера указаны на рис. 25. $H-2^{ol}$ и $H-2^{oh}$ несут локус K от $H-2^d$ и локус D от $H-2^k$ и различаются только по позиции кроссинговера — одна несет Ss^l , а другая — Ss^h . С другой стороны, $H-2^{al}$ несет локус K от $H-2^k$ и локус D от $H-2^d$. Тип иммунного ответа этих трех рекомбинантных хромосом $H-2$ всегда совпадал с типом иммунного ответа доноров локуса K рекомбинантной хромосомы $H-2$. Это опять-таки означает, что $Ig-1$ либо тесно связан с локусом K , либо идентичен с ним, или лежит где-то слева от него в IX группе сцепления. На основании данных, представленных выше, мы не можем более точно определить локализацию $Ig-1$ по отношению к локусам K и D комплекса $H-2$. Однако, когда мы определяли тип иммунного ответа еще одного рекомбинанта $H-2$, выявленного Shreffler, мы получили данные, говорящие о более точной локализации. Кроссинговер, который дал эту новую хромосому $H-2$, схематически представлен на рис. 26, показывающем, что это был кроссинговер между $H-2^{al}$ (см. предыдущий рисунок) и $H-2^s$. Рекомбинантная хромосома $H-2$, получившая обозначение $H-2^{ll}$ несет локус K от $H-2^s$, локус Ss от $H-2^k$ и локус D от $H-2^d$. Мыши, гомозиготные по этой рекомбинантной хромосоме $H-2$, отвечали на (Т, Г)-А--Л и (Н, Г)-А--Л, (Ф, Г)-А--Л так, как отвечают мыши, несущие гаплотипы $H-2^{al}$ и $H-2^k$, но не так, как мыши, несущие гаплотипы $H-2$. На первый взгляд этот результат означает,

что Ig-1 находится чуть справа от локуса H-2K, между локусами H-2K и Ss в левой центральной части комплекса H-2.

Можно сделать этот вывод, поскольку рекомбинантная хромосома H-2¹¹ ведет себя подобно родительскому гаплотипу H-2^{a1}, следовательно, Ig-1 находится справа от точки кроссинговера, давшего H-2¹¹. Так как данные по всем остальным рекомбинантам H-2 указывают на локализацию Ig-1 слева от точки кроссинговера, следует допустить, что этот кроссинговер прошел ближе к H-2K, чем любой из остальных, ранее изученных, так, что Ig-1 оказывается справа от точки кроссинговера.

К сожалению, существует и другая возможность, что Ig-1 находится слева от локуса H-2K в IX группе сцепления и что кроссинговер, давший аллель H-2¹¹, фактически является двойным: один кроссинговер происходит между локусами K и Ss, а другой где-то слева от локуса K и между локусом K и генами Ig-1. Такой двойной кроссинговер исключить нельзя, так как первоначальный кроссинговер между H-2^{a1} и H-2^s не вовлекал наружных маркеров справа от локуса D и слева от локуса K, что дало бы возможность ясно определить, был ли кроссинговер одинарным или двойным.

К счастью, Kleip получил рекомбинантные линии H-2 в результате кроссинговера, который был одинарным, как доказано при помощи наружных маркеров. Происхождение этой новой хромосомы H-2 представлено на рис. 27. Опять-таки я пользуюсь своей упрощенной терминологией для генов на хромосоме H-2^a. Родительские хромосомы при этом кроссинговере представляли собой H-2^a и H-2^a. Однако аллель H-2^a принадлежал хромосоме, которая несла легко распознаваемые генетические маркеры по обеим сторонам комплекса H-2, а именно: ген T (brachyuигу) слева от локуса K H-2 и транслокация T-138 справа от локуса D H-2. Кроссинговер, представленный пунктирными линиями, на рисунке был одинарным, как было доказано по одновременной рекомбинации между наружными маркерами T (brachyuигу) и транслокацией 138, первоначально находившимися на родительской IX группе сцепления, которая несла гаплотип H-2^a. Этот кроссинговер дал хромосому H-2^y, показанную внизу рисунка, которая несет локус K от H-2^a и локусы Ss и D H-2^a. Мыши, гомозиготные по этой рекомбинантной хромосоме H-2, отвечают на (T, Г)-А--Л, (H, Г)-А--Л и (Ф, Г)-А--Л также как мыши, несущие гаплотип H-2^a. Результат тот же, что и в случае гаплотипа H-2¹¹. Это вновь показывает, что Ig-1 находится непосредственно справа от точки кроссинговера, и, следовательно, на карте занимает место между локусом K и локусом Ss в центре комплекса H-2. Известно, что хромосома H-2^y образуется в результате одинарного кроссинговера, поэтому такую позицию Ig-1 можно считать доказанной.

Одновременно с изучением рекомбинантных хромосом H-2 мы провели обычное скрещивание для картирования. При этом скрещивании одна родительская линия несла ген T (brachyuигу), ген *tf* (ген волнообразного выпадения шерсти) и гаплотип H-2^a. Другая родительская линия имела дикий тип локусов T и *tf* и несла гаплотип H-2^s. Гибриды F₁ от того скрещивания затем были возвратно скрещены с линией несущей гаплотип H-2^s и потомство этого скрещивания было исследовано на T, *tf* и тип H-2. Затем у всех животных, у которых обнаружен кроссинговер, исследовался генотип иммунного ответа. Среди 484 потенциальных рекомбинантов были выявлены только две мыши, которые, видимо, были рекомбинантами между Ig-1 и комплексом H-2. При дальнейшем тестировании этих рекомбинантов и их потомства было установлено, что оба рекомбинанта были по существу кроссоверами между локусами K и D в комплексе H-2. Таким образом, животные, которые при предварительном отборе характеризовались рекомбинацией

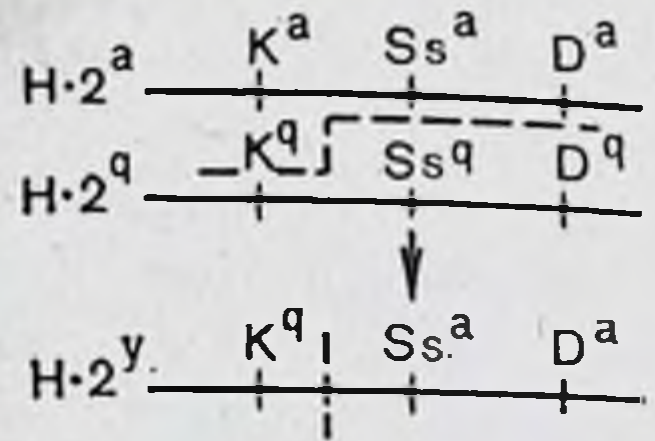
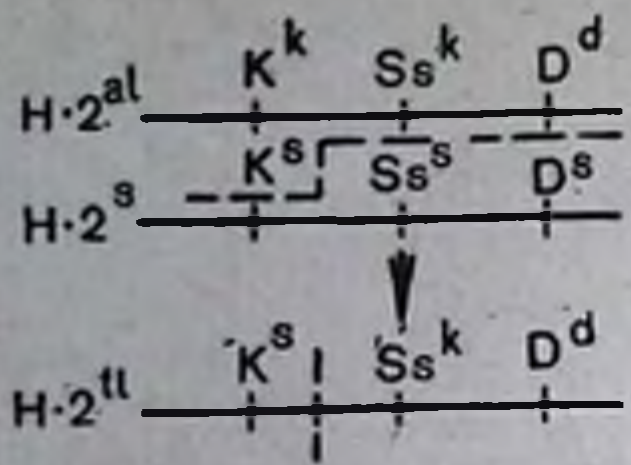


Рис. 26. Упрощенная схема результатов кроссинговера между $H-2^{al}$ и $H-2^s$, в результате чего образуется новая $H-2$ -хромосома, несущая гаплотип $H-2$, $H-2^{tb}$ -хромосома несет $H-2$ локус от $H-2^s$, тогда как центральная часть ее комплекса происходит от $H-2^k$, а $H-2D$ локус происходит от $H-2^d$.

Рис. 27. Схема кроссинговера между $H-2^a$ и $H-2^b$ линии T-138, несущей внешний маркер, приводящего к образованию рекомбинантной хромосомы $H-2^y$.

между $Ig-1$ и $H-2$, как выяснилось в дальнейшем, были рекомбинантами внутри самого комплекса $H-2$. Эти данные полностью соответствуют приведенным выше и поддерживают мнение, что $Ig-1$ локализуется в левой центральной части комплекса $H-2$ между локусом K и локусом Ss .

Пока еще не было проведено окончательных исследований для составления карты по ряду других генов иммунного ответа. Согласно предварительным результатам, гены иммунного ответа контролируют отторжение мужского Y -трансплантационного антигена, иммунный ответ на ГАТ и иммунный ответ на яичный альбумин. Показано, что Ig -гены связаны с концом K комплекса $H-2$. Однако Lieberman недавно получила данные, которые она представит позднее, что гены иммунного ответа, контролирующие ответ на аллели I_g^a иммуноглобулиновых аллотипов γ_A и γ_{2a} , видимо, локализируются в том же участке комплекса $H-2$, между локусом K и локусом Ss . К тому же мы недавно получили предварительные указания на то, что гены иммунного ответа, контролирующие иммунный ответ на два других антигена, локализируются точно в том же регионе. Все эти данные означают, что гены иммунного ответа, расположенные в линейном порядке в участке хромосомы, лежащем между локусом K и локусом Ss , видимо, где-то в середине комплекса $H-2$.

Трудно установить, из скольких специфических генов иммунного ответа состоит этот линейный набор. Может быть, некоторые из них располагаются слева от локуса K или справа от локуса Ss . По упомянутым выше причинам мы считаем, что гены иммунного ответа для разных антигенов представляют собой эффект разных генных локусов, поэтому мы можем лишь самым грубым предварительным образом сказать, что таких генов много. Почти 20 из них уже идентифицированы у мышей. Эти гены контролируют ответ на синтетические полипептидные антигены, трансплантационные антигены, иммуноглобулиновые изоантигены и сложные белковые антигены, и они все чаще выявляются исследователями. В связи с этим мы можем предположить, что безусловно насчитывается более 10 таких генов, а если бы мы могли выявить все гены, то, возможно, их оказалось бы несколько сотен.

Таким образом, у нас имеются довольно убедительные доказательства позиции, которую занимает на карте локус $Ig-1$, а также основание предполагать, что другие гены иммунного ответа локализируются в той же области, и мы имеем также грубый предварительный подсчет количества этих специфических генов иммунного ответа. Значительно большие трудности пред-

стают перед нами, когда мы пытаемся определить возможные характеры и значение этой тесной связи между Ig-генами и генами гистосовместимости и характер самих продуктов Ig-генов.

На предшествующей сессии говорилось о том, что эти гены почти несомненно проявляются в лимфоцитах тимусного происхождения, реагирующих с антигенами, т. е. в Т-клетках. Пока еще продолжаются споры о том, проявляются ли они также в В-клетках, вырабатывающих антитела. В общем я пришел к выводу, что Ig-гены проявляются исключительно в Т-клетках и что они тесно связаны с механизмом распознавания антигенов Т-клетками.

Сейчас, пожалуй, целесообразно привести некоторые данные, говорящие о том, что Ig-гены никак не родственны с иммуноглобулиновыми структурными генами легких или тяжелых цепей известных иммуноглобулиновых классов. Мы знаем, что ген Ig-1 у мышей не сцеплен с локусами иммуноглобулиновых аллотипов, связанными с постоянными областями групп сцепления тяжелых цепей. Если исходить из данных по сцеплению аллотипов, полученных у кроликов, согласно которым гены переменной и постоянной области тяжелых цепей тесно сцеплены, то какая-либо связь Ig-генов со структурными генами тяжелых цепей исключена.

У мышей главной легкой цепью является κ -цепь. У мышей не существует маркера аллотипа для κ -цепи, но мы знаем, что у человека антигены HL-A, которые формально аналогичны генам H-2 у мышей, не сцеплены с Ipv-локусом, представляющим собой человеческий генетический маркер константной области κ -цепей. Если допустить, что константная и переменная области легких цепей сцеплены так же, как области тяжелых цепей у кролика, то это означает, что Ig-гены не связаны со структурными генами легких цепей. Кроме того, наши самые первые исследования показали, что у кроликов способность реагировать на (Т, Г)-А--Л находится под генетическим контролем. Конечно, не могло быть доказано сцепление с генами гистосовместимости у кролика, но если допустить, что это пример кроличьего гена специфического иммунного ответа, сцепленного с гистосовместимостью, то наши старые неопубликованные данные (полученные вместе с Gell и Kelus) означают отсутствие связи между способностью сильно отвечать на (Т, Г)-А--Л и локусами иммуноглобулиновых аллотипов а или b, связанными с группой сцепления тяжелых цепей и с κ -цепью у кролика соответственно. Таким образом, на основании прямых наблюдений и ряда допущений по генетике синтеза иммуноглобулинов собрано довольно много данных, показывающих, что Ig-гены не связаны со структурными генами переменных областей легких или тяжелых цепей известных классов иммуноглобулинов.

Мне кажется, что существуют три основных предположения, которые можно выдвинуть в отношении характера продуктов Ig-гена. Первое заключается в том, что Ig-гены представляют собой новый класс тяжелых цепей, аналогичных IgX или IgT, существование которых постулировано другими исследователями и которые функционируют как специфический антигенный рецептор на клетках тимусного происхождения, хотя этот новый тип иммуноглобулиновых тяжелых цепей является единственным в своем роде; в других отношениях он может быть подобен остальным тяжелым цепям, но связан лишь с поверхностью клеток и никогда не циркулирует в крови. Если это так, то механизм, объясняющий разнообразие этого класса специфических антигенных рецепторов, очевидно, подобен такому же механизму для других иммуноглобулиновых полипептидных цепей, какова бы ни была природа этого механизма.

Существуют некоторые основания предположить, что специфичность распознавания антигенов Т-клетками носит иной характер, чем распознавание антигена на уровне В-клеток, однако все эти данные не прямые и на мой взгляд недостаточны, чтобы исключить существование нового класса тяжелых цепей иммуноглобулина, присущего только Т-клеткам.

Второе предположение состоит в том, что мы имеем перед собой совершенно новый тип распознавания антигена, имеющий иную молекулярную основу, чем классические иммуноглобулины. Опосредовано ли это распознавание антигенов сложным набором антигенов гистосовместимости на поверхности Т-клеток или каким-то совершенно новым молекулярным механизмом, пока абсолютно неизвестно. Мы не располагаем данными, которые бы подтверждали или опровергали эти предположения.

Меня больше всего привлекает гипотеза о том, что первичные рецепторы на поверхности клеток, образовавшиеся в ранней стадии эволюции многоклеточных организмов, постепенно приобрели способность подвергаться каким-то соматическим изменениям. Вполне возможно, что началом был ряд редуцированных генов, кодирующих различные рецепторы клеточной поверхности, которые выполняли ряд разных функций распознавания. На каком-то этапе эволюции некоторые из этих антигенов клеточной поверхности, возможно, взяли на себя функции константной части поверхностного продукта, а другие приобрели способность к соматической изменчивости. В процессе эволюции эта первичная система выработки распознающих центров на клеточной поверхности, возможно, настолько редуцировалась, что образовались связанные с клеткой центры распознавания на поверхности Т-клеток, с одной стороны, и генные комплексы, которые в конечном счете локализовались на других хромосомах и образуют группы сцепления тяжелых и легких цепей, — с другой. Такая гипотеза предполагает общее генетическое происхождение и какие-то структурные аналогии между антигенами гистосовместимости и иммуноглобулиновыми молекулами. Конечно, эта гипотеза не нова и в другой форме была выдвинута Vignet и другими авторами. Мне трудно выбрать одно из этих двух основных предположений, а именно, что Ig-гены представляют собой новый класс тяжелых цепей, или что они представляют собой особую систему распознавания антигенов, отличающуюся от классических иммуноглобулинов, но, возможно, являются генетическим предком современных иммуноглобулиновых легких и тяжелых цепей.

Третье, основное предположение, объясняющее механизм действия Ig-гена, заключается в том, что продукты Ig-генов являются по существу комплексом ряда антигенов клеточной поверхности, возможно, близкородственных антигенам гистосовместимости, которые находятся в тесной связи с классическими иммуноглобулиновыми рецепторами на поверхности Т-лимфоцитов. В начале этих исследований, когда наблюдалась только одна связь между геном специфического иммунного ответа и антигенами гистосовместимости, эта гипотеза казалась мне гораздо более привлекательной. Однако теперь стало ясно, что существует большое количество генов специфического иммунного ответа, обладающих большой иммунологической специфичностью. Есть также довольно много указаний на то, что большинство легко идентифицируемых молекул, присутствующих на поверхности клетки и в клеточной мембране, могут свободно перемещаться и перестраиваться в относительно вязком море липидов, с которыми можно сравнить клеточную мембрану. На мой взгляд, ввиду этих двух наблюдений трудно предположить, что Ig-гены являются результатом модулирующего влияния классических антигенов гистосовместимости на взаимодействие

иммуноглобулинов с их специфическими антигенами. Конечно, существуют и другие возможные предположения относительно характера Ig-генов, но, учитывая данные, рассмотренные на предыдущей и настоящей сессиях, я считаю, что в настоящее время наиболее вероятными представляются три вышеизложенные гипотезы.

Benaseraf. Я не понимаю, чем различаются первая и вторая гипотезы, изложенные McDevitt. По существу они равнозначны.

Председатель McDevitt. Разница между первой и второй гипотезами очень велика, первая гипотеза предполагает, что Ig-гены по существу являются новым особым классом тяжелых цепей. Вторая гипотеза представляет собой две вариации на ту же тему: первая — что Ig-гены являются новым и совершенно особым типом системы, распознающей антигены с особой молекулярной основой, характер которой пока неизвестен. Согласно второй вариации, Ig-гены близкородственны антигенам гистосовместимости по структуре и, возможно, являются первичными генами, из которых в процессе эволюции и редупликации образовались структурные гены для иммуноглобулинов. Могут возникнуть и другие предположения, о которых я не говорил раньше, а именно: что Ig-гены представляют собой короткие последовательности нуклеотидов, вставленные в гипервариабельные участки генов вариабельных областей иммуноглобулинов. Я полагаю, что эта гипотеза маловероятна, но все же ее надо учитывать.

Herzenberg. Я думаю, что убедительным доводом против первой гипотезы McDevitt является то, что все известные гены тяжелых цепей у всех исследованных видов сцеплены. Сейчас он предполагает существование нового гена тяжелых цепей, не сцепленного с другими известными генами тяжелых цепей. Думаю, что это весьма мало вероятно.

Председатель McDevitt. Сцеплены ли гены для легких цепей каппа и лямбда?

Herzenberg. Нет. Известно, что они не сцеплены. Но все тяжелые цепи сцеплены. Как и в гемоглобинах, все гены, кроме генов альфа-цепей, сцеплены, но гены альфа- и бета-группы не сцеплены.

Председатель McDevitt. В том-то и дело. Мы знаем, что существуют отдельные гены на отдельных хромосомах для двух разных типов легких цепей иммуноглобулинов. Поэтому мне кажется столь же возможным, что существуют два разных и генетически обособленных хромосомных региона для двух разных групп сцепления тяжелых цепей. В одну группу входят известные циркулирующие иммуноглобулины, а вторая — кодирует иммуноглобулины IgX и IgT, находящиеся только на поверхности T-клеток.

Herzenberg. Естественно, как знает и McDevitt, в этом мире возможно все. Но мне кажется, что лучше было бы высказывать только такие гипотезы, которые можно проверить, а может быть даже те, которые имеют какой-то прецедент.

Председатель McDevitt. Прецедент я уже назвал: существование самостоятельных групп сцепления для двух разных типов легких цепей иммуноглобулинов. Последовательности аминокислот в вариабельных областях каппа- и лямбда-цепей показывают, что они различны. Таким образом, каким бы ни был механизм, определяющий разнообразие, имеется один механизм для легких цепей каппа, другой — для легких цепей лямбда и третий — для группы сцепления тяжелых цепей. Я предполагаю только существование еще одной дополнительной группы сцепления тяжелых цепей с ее генератором разнообразия, не вдаваясь в характер его механизма.

Herzenberg. Может быть, то, что вы предлагаете, следует называть четвертым типом иммуноглобулиновой цепи, новым типом. Я согласен с Ве-

пасеггаф. Не понимаю, в чем разница между первой и второй гипотезами.

Председатель McDevitt. Я говорю сейчас о классе молекул, который, возможно, не имеет никакой структурной аналогии с иммуноглобулинами, а совершенно отличается от них.

Herzenberg. Хочу напомнить McDevitt, что как раз эту мысль высказывал Вепасеггаф. Я хотел бы предложить McDevitt отказаться от слова «новый». Если он настаивает на своей гипотезе, то следует говорить о старом классе с точки зрения эволюции.

Председатель McDevitt. Я согласен с Herzenberg. Мне надо было бы сказать: «новый для нас».

Bodmer. Полагаю, что надо иметь в виду то, о чем говорил McDevitt, а именно: связь с эволюцией. Разница между его первыми двумя гипотезами сводится к чистой семантике, если только не затронуть вопроса о том, связана ли эволюционная система распознавания с цепями V и С иммуноглобулиновой системы или нет. Вопрос о том, следует ли назвать набор переменных тяжелых цепей новым или нет, не имеет значения. Важно эволюционное происхождение рецепторов Т-клеток. Если, как мы предполагали ранее, гены в локусе HL-A и ген иммуноглобулинов имеют общее эволюционное происхождение, то эти две гипотезы можно согласовать между собой и допустить любые различия между ними, учитывая, что эти различия могли возникнуть за миллионы лет, прошедшие с тех пор, как эти два набора генов разделились. Таким образом, по существу вопрос стоит следующим образом: происходит ли в эволюционном смысле система распознавания из тех же наборов генов, что и иммуноглобулиновые гены, или нет?

Sela. Разве первую и вторую гипотезы нельзя полностью разделить с молекулярной точки зрения? Первая гипотеза предполагает разницу по участку связывания, обусловленную новым классом тяжелых цепей. Напротив, вторая гипотеза предполагает совершенно новый механизм распознавания, новые молекулы, которые, возможно, имеют иную специфичность.

Вепасеггаф. H-сцепленные Ig-гены не связаны со структурными генами тяжелых цепей известных нам иммуноглобулинов, поэтому, по всей вероятности, они не кодируют V-области, общие для всех тяжелых цепей. Каждый из нас может избрать гипотезу по своему выбору, но я голосовал бы за вторую гипотезу.

Herzenberg. Biozzi заставляет меня выступить с этим замечанием, но он не виноват. Позднее он скажет нам, почему, по его мнению, имеется по крайней мере десять разных генов, влияющих на иммунный ответ на разные антигены. Один сцеплен с аллотипом, другой — с H-2 и т. д. Следовательно, есть ли основание избирать Ig-1 как ген, контролирующий рецепторы в предпочтении многим другим генам?

Председатель McDevitt. Все, что мы выслушали на первой сессии, говорит о том, что H-сцепленные Ig-гены влияют на распознавание антигенов на уровне Т-клеток.

Herzenberg. Возможно, это так, но никто из нас не изучал остальные восемь генов. Если рассуждать, как McDevitt, то у нас должно быть еще восемь классов иммуноглобулинов, контролируемых этими восьмью генами.

Председатель McDevitt. Лишь в том случае, если Herzenberg или другие докажут, что они влияют на распознавание антигенов и не сцеплены с аллотипами иммуноглобулинов.

Вепасеггаф. Я работал по этой проблеме с Biozzi. Основные генетические различия сильно и слабо отвечающих линий Biozzi касаются генов, которые регулируют дифференцировку В-клеток и их пролиферацию, а также коли-

чество иммуноглобулина, независимо от специфичности. Тем не менее линии были селекционированы на основании их способности отвечать образованием антител на бараньи эритроциты. Поэтому возможно, что селекция в низкоотвечающей линии была направлена против Ig-генов, связанных с распознаванием антигенов бараньих эритроцитов. Возможно, поэтому один из генов, связанных с селекцией, оказался сцепленным с аллотипами тяжелых цепей.

Председатель McDevitt. Теперь, мне кажется, нам надо перейти к вопросу о соотношениях между генами, контролирующими те антигены клеточной поверхности, которые стимулируют реакцию СКЛ, и другими генами, входящими, как известно, в комплекс H-2. По этому вопросу выступит **Wach.**

Wach. Вначале я сказал бы, что я отдаю себе отчет в том, как нам повезло. Мы работали с системой, связанной с H-2, и, таким образом, имели возможность воспользоваться рекомбинантами, выведенными за последние годы. Подавляющее большинство данных, относящихся к мышам, было получено вместе с Klein. Кроме того, нам прислали мышей Shreffler, Stimpfling и Bailey. Большую помощь оказал Widmer — наш практикант, работавший с моей женой и со мной. Я хотел бы описать использованный нами тест СКЛ и отношение его к основному комплексу гистосовместимости, описанному здесь. Для исследования человеческих клеток мы пользовались периферической кровью. В опытах с мышами мы брали клетки из селезенки. Для обозначения взаимодействия клеток я обозначу одного донора — человека или мышь — буквой А, а второго донора, буквой В. Во всех случаях мы исследуем ответ лимфоцитов А *in vitro* на «чужеродность», связанную с основным комплексом гистосовместимости на клетках В. Для того чтобы обеспечить одностороннюю реакцию, мы обрабатываем клетки В митамицином С. Обработанные клетки обозначаются строчной буквой m. Для того чтобы установить, происходит ли стимуляция, мы сравниваем число импульсов в минуту (СРТ), радиоактивного тимидина, включенного в такую аллогенную смесь, с изогенным или сингенным контролем, где мы смешиваем клетки А с собственными клетками этого же индивида, обработанными митомицином С. Наблюдения, сделанные как у человека, так и у мышей, позволяют думать, что основной генетический контроль стимуляции при тесте СКЛ (определяемый по включению радиоактивного тимидина в аллогенной смеси по сравнению с контрольными смесями) связан с комплексом HL-A или H-2.

Festenstein и другие получили некоторые указания на то, что локусы у мышей, аллели которых расцепляются независимо от H-2, могут вызвать активацию СКЛ. Однако это исключение, а не общее правило. Таким образом, реакцию СКЛ можно в основном связать с различиями по главным системам гистосовместимости.

У человека, как и у мыши, эти системы очень сходны. Мы имеем сегменты хромосомы, где находятся два локуса, продукты которых определяются с помощью антисывороток, т. е. серологически определяемые локусы. У человека они обозначаются FOUR и LA, у мыши — H-2D и H-2K. Долгое время предполагалось, что реакция СКЛ обусловлена распознаванием клетками А чужеродного локуса FOUR или LA или локусов H-2K и H-2D, т. е. серологически определяемыми антигенами, связанными с этими локусами. Данные, которые я хотел бы представить, относятся к генетическому контролю СКЛ и позволяют думать, что стимуляция СКЛ в основном обусловлена как у мыши, так и у человека другими генетическими локусами, не определяемыми серологически. Эта работа основана на исследовании человеческих клеток и поэтому я хотел бы вкратце остановиться на совре-

менном состоянии вопроса при исследовании клеток человека. Я хотел бы заметить, что у человека, поскольку мы не имеем дела с гомозиготными линиями, имеются два антигена локуса LA и два локуса FOUR, и, таким образом, мы часто имеем перед собой четыре антигена, определенных у каждого индивида.

В табл. 32 показаны результаты типирования HL-A у 2 сибсов — JH и VH, привлеченных к исследованию Amos и мной. В этом исследовании

ТАБЛИЦА 32
Типирование семьи с двумя реактивными в СКЛ
и идентичными по HL-A близнецами

Семья	H ^a
Отец	2, R ^a A/3,7
Мать	9,12/L1 — FE 71.3, FJH—AJ
I. H	2, R ^a /L1 — FE 71.3, FJH—AJ
V. H	2, R ^a /L1 — FE 71.3, FJH—AJ

^a Типирование выполнено Kissmeyer-Nielsen.

мы установили первоначальную корреляцию между основным комплексом гистосовместимости и реактивностью в СКЛ. Конечно, согласно общему правилу, если 2 сибса унаследовали одни и те же хромосомы HL-A или гаплотипы от их родителей, т. е. одни и те же четыре антигена из системы HL-A, то их клетки не стимулируются в смешанных культурах. Однако в этой первой серии опытов мы установили, что, хотя эти 2 сибса явно унаследовали одни и те же 4 антигена от их родителей, клетки их стимулировались в смешанной культуре. Гипотеза, выдвинутая в то время Amos и мной, в значительно более элегантной форме представлена на рис. 28, соответственно новейшим предложениям Yunis и Amos. Практически мы установили, что реактивность в СКЛ, возможно, не контролируется полностью серологически определяемыми антигенами и контролируется также локусом, обособленным от серологически определяемых локусов, но сцепленным с ними. Аллели этого другого локуса обозначаются буквами W, X, Y, Z, тогда как цифры относятся к антигенам HL-A. Мы говорим о «скрещивании» 2 указанных здесь родителей. Наше основное наблюдение заключалось в том, что 2 сибса унаследовали одни и те же гаплотипы HL-A от своих родителей, но все же их клетки стимулировались в смешанной культуре. Следовательно, мы предположили существование другого локуса, сцепленного с системой HL-A, который было трудно определить серологически и все же из-за рекомбинации у матери, которая привела к появлению гаплотипа 1, 8, X у одного сибса, эти 2 сибса различались по «третьему локусу». Следовательно, их клетки стимулировались из-за различия в этом локусе, которое было трудно выявить серологически.

Подробнее этот феномен рассмотрит van Rood и другие участники конференции. Я хочу лишь отметить, что в то время нам казалось возможным, что такие локусы, способные вызвать активацию лимфоцитов, но с трудом выявляемые серологически, существуют у человека в связи с главной системой гистосовместимости. Карта главной системы гистосовместимости должна включать, как показано на рис. 29, локус LA, локус FOUR и еще один локус, слева от локуса FOUR, который можно выявить по реактивности лимфоцитов. Я не хочу еще больше усложнять номенклатуру, поэтому я бу-

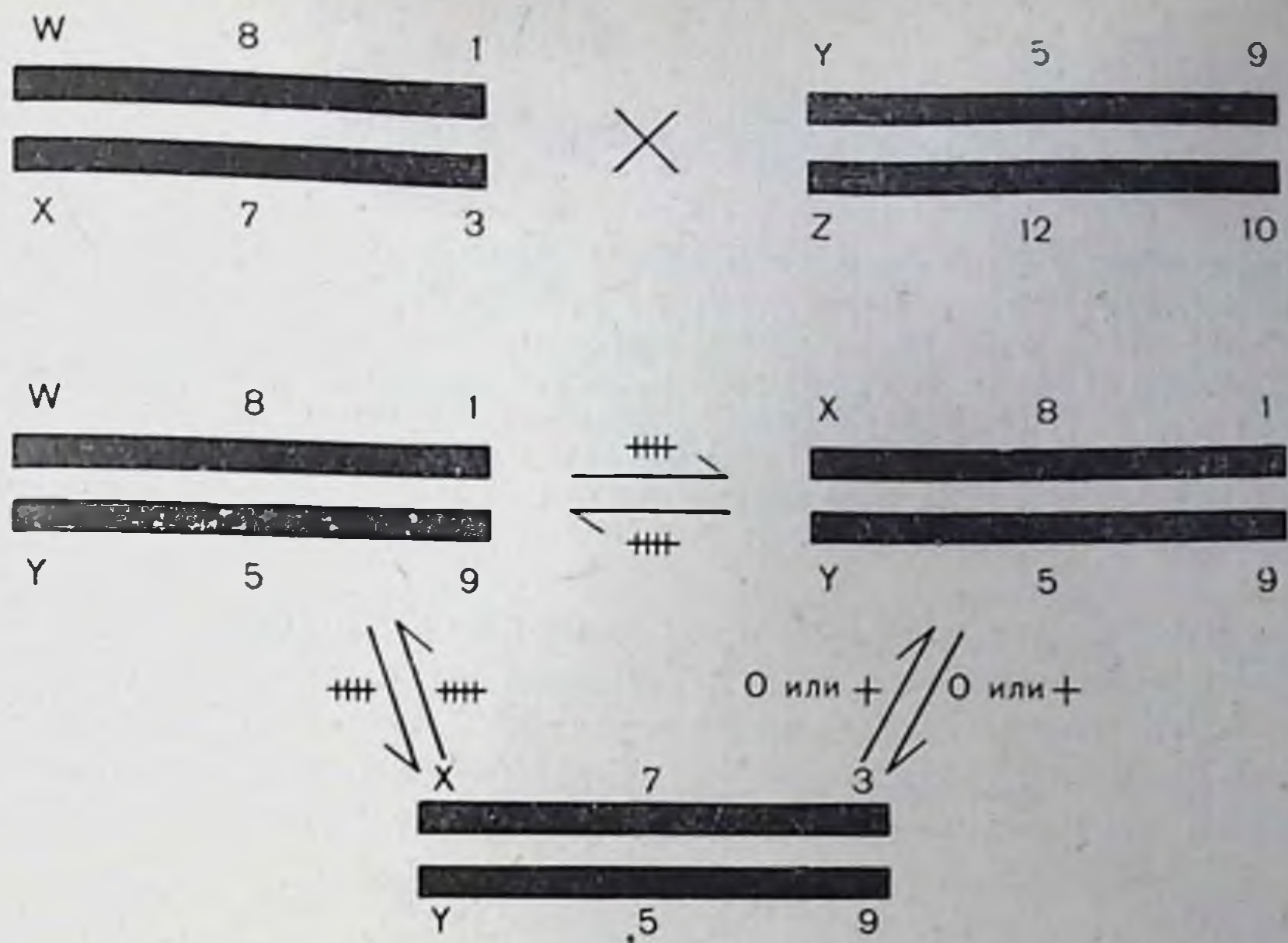


Рис. 28. Схема системы HL-A со сцепленным LD-локусом. Показан главный комплекс гистосовместимости в одной семье. Цифры относятся к антигенам HL-A-локусов LA и Four, буквы представляют собой аллели LD-локуса. Один из родителей несет гаплотипы 1, 8W и 3,7X, другой родитель — 9,5Y и 10,12Z. Два близнеца, которые наследуют одинаковые аллели HL-A и, следовательно, одни и те же антигены HL-A, могут различаться по LD-локусу в результате рекомбинации у одного из родителей. В данном случае рекомбинация у первого родителя приводит к образованию гаплотипа 1,8X. Эти два близнеца дают реакцию в СКЛ. Знаки + указывают на стимуляцию в СКЛ

ду называть этот локус LD, т. е. локусом, определяемым лимфоцитами (lymphocyte defined)

Вполне возможно, что локусы LD находятся между FOUR и LA.

Мы пытались установить, существуют ли генетические различия в этой области у мышей, которые могут привести к активации лимфоцитов в СКЛ и которые тем не менее трудно выявить при помощи современной методики, основанной на использовании цитотоксических или агглютинирующих антител. Наши первые исследования были проведены вместе с Bailey. Bailey нашел спонтанную мутацию главной системы гистосовместимости мыши, приводящую к отторжению трансплантата, которую он картировал слева от локуса Ss. Мы не знаем, находилась ли она между Ss и H-2K, в пределах H-2K или слева от H-2K. Bailey вывел конгенную линию, генетически тождественную C57Bl/6, за исключением этой единственной мутации. Он назвал новую линию H(r1). Таким образом, мы имеем две конгенные линии, характеризующиеся тем, что при обмене кожи между ними трансплататы отторгаются. Мыши линии H(r1) отторгали кожу C57Bl/6, мыши линии C57Bl/6 отторгали кожу H(r1). Интересным наблюдением было то, что при перекрестной иммунизации этих животных не было обнаружено серологических различий. Различия между клетками этих двух линий, которые невозможно было уловить при помощи обычных методов иммунизации и тестирования, все же привели к активации в СКЛ в обоих направлениях. Поэтому вместе с Klein мы пытались установить — можем ли мы еще больше разделить эту область и использовать уже найденных мутантов и рекомбинантов, чтобы установить, где находятся локусы, вызывающие активацию в СКЛ в пределах комплекса H-2.

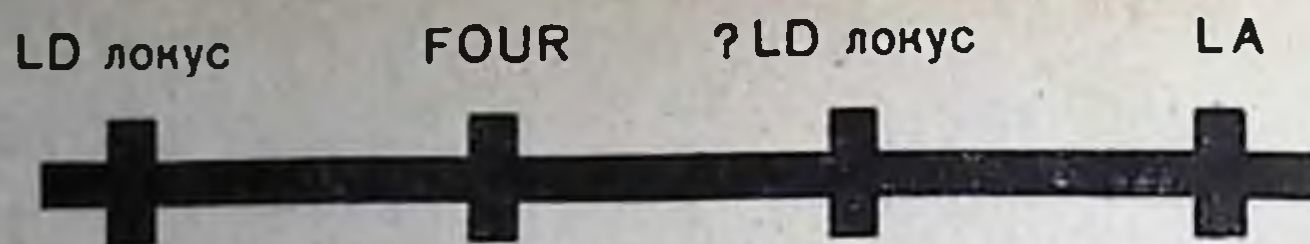


Рис. 29. Генетическая карта главного комплекса гистосовместимости человека. При том способе, которым нарисован HL-A-локус на этой карте, LD-локус помещен слева от Four, для того чтобы объяснить описанные данные. Возможный LD-локус между Four и LA объяснил бы стимуляцию между близнецами, идентичными по LD-локусу, расположенному слева от Four. У близнецов, которые имеют одинаковые аллели LD-локуса, но отличаются по антигенам HL-A, отсутствует или имеется слабая стимуляция; слабая стимуляция может быть вызвана разницей по LD-локусу между Four и LA.

Я хочу отметить, что мы испытали более 300 комбинаций. Все эти комбинации были реципрокными. Хочу показать здесь результаты теста СКЛ у мышей, различающихся только по гену H-2K, только по участку I γ -Ss-Slp и только по гену H-2D. Необходимо сделать несколько замечаний о том, как интерпретируются данные. Важнейшие тесты приведены в табл. 33. Я уже говорил, что мы искали значительную разницу между числом импульсов в минуту радиоактивного тимидина в аллогенных СКЛ и в сингенных контролях.

ТАБЛИЦА 33
Оценка значения стимуляции в СКЛ

1. «t»-тест по log данных.
2. Метод пропорций. Выражается отношением имп/мин, включенных в аллогенную СКЛ, к имп/мин в контрольной изогенной или сингенной смеси.
3. Сравнение имп/мин, включенных в данную аллогенную смесь, с имп/мин в других аллогенных смесях с использованием тех же отвечающих клеток.

Для этого можно применить «t»-тест, т. е. вычислить результат в отношении импульсов, включенных в аллогенную СКЛ, к импульсам в изогенной контрольной смеси или сравнивая число импульсов в минуту в данной аллогенной смеси с числом импульсов в минуту в других аллогенных смесях в том же опыте с теми же отвечающими клетками (табл. 34). Мы пользовались всеми этими методами для того, чтобы выяснить ответ на интересующий нас вопрос.

ТАБЛИЦА 34
Реакции СКЛ между конгенными линиями мышей, отличающихся по определенным частям H-2 комплекса

Отвечающие клетки	Стимулирующие клетки				
	C57BL/10	B10.Br	B10. A	B10.A(1R)	B10.A(5R)
C57BL/10	(7) ^a	57 ^b	88 ^b	54 ^b	20 ^г
B10.Br	78 ^b	(17)	19 ^г	18 ^г	46 ^b
B10.A	129 ^b	26 ^г	(10)	14 ^г	59 ^b
B10.A(1R)	72 ^b	36 ^г	26 ^г	(12)	44 ^b
B10.A(5R)	28 ^г	73 ^b	59 ^b	56 ^b	(9)

^a имп/мин в тысячах.

^b Различия по H-2K и H-2D.

^в Различия по H-2K.

^г Различия по H-2D.

В табл. 34 показан эксперимент, в котором мы исследовали ответ клеток пяти разных линий. Отвечающие клетки перечислены слева, стимулирующие клетки или клетки, обработанные митомидином С, указаны в верхней части таблицы. Контрольные клетки С57BL/10 включают 7000 имп/мин, а стимуляция в аллогенных смесях колеблется от 20 000 до 88 000 имп/мин. Все эти величины стимуляции с отвечающими клетками С57BL/10 высокодостоверны с $p < 0,001$.

В табл. 34 указана разница между стимулирующей клеткой и отвечающей клеткой по локусам Н-2К, Н-2D или по обоим локусам. Прежде всего надо заметить, что мы смогли вызвать стимуляцию, в отличие от данных Ruchlikova и соавт., даже если различия были только в конце Н-2D.

Представив табл. 35 — 40, я хочу показать, как мы разделили эту область. В табл. 35 приведены данные для мышей, которые различались

ТАБЛИЦА 35

Результаты изучения СКЛ с лимфоцитами, различающимися только по Н-2D

В10. Т(6R) В10. G		Н-2К	Iг-1	Ss-Slp	Н-2D		
		q q	q q	q q q q	d q		
СКЛ	Количество экспериментов	Отношение экс п./контр.		Достоверность различия			
		среднее	диапазон	n/g*	<0,05	<0,05	<0,001
6R(В10. G) _m	3	1,39	0,82—2,14	2	1	—	—
В10·G(6R) _m	3	3,44	1,99—5,36	—	1	1	1

* Недостоверно.

только по концу Н-2D. Две использованные линии были идентичны по Н-2К, Iг и Ss—Slp, но различались по концу Н-2D. При ответе клеток В10, Т(6R) на стимулирующие клетки В·10G в 3 разных опытах среднее отношение радиоактивности аллогенных клеток к контрольным клеткам составляло 1,4 в пределах от 0,82 до 2,14. Далее, разница между этими ответами согласно «t»-тесту обычно была недостоверна или слабо достоверна. В трех опытах противоположного направления мы имели ответы различной достоверности, причем отношение стимуляции обычно было низким. Мы неохотно делаем качественные сопоставления, но в общем можно сказать, что степень стимуляции при различиях только по Н-2D была относительно слабой. В табл. 36 дана сводка всех опытов, проведенных нами на мышах с различия-

ТАБЛИЦА 36

Суммарные результаты СКЛ во всех комбинациях с различиями на Н-2D

Количество линий	Количество комбинаций	Отношение	
		среднее	диапазон
12	26	1,56	0,24—2,34

ми только по Н-2D. Было тестировано 12 линий в 26 разных комбинациях, каждая не менее 2 раз; несколько линий — значительно большее число раз, среднее отношение стимуляции составляло 1,56, значение p указывало на разные степени достоверности, начиная от недостоверной до высоко

достоверной. Таким образом, некоторые различия по H-2D стимулируют, а другие различия не стимулируют реакцию в СКЛ, согласно изложенному критерию, но в среднем стимуляция значительно меньше, чем при использовании линий, различающихся по всем областям.

Обратимся к другому концу основной системы гистосовместимости H-2K. В табл. 37 показана одна из исследованных комбинаций AQR и B10.A.

ТАБЛИЦА 37

Результаты изучения СКЛ при различиях только по H-2K

	H-2K	I _n -1	Ss-Slp	H-2D			
AQR	q	k	dd	d			
B10.A	k	k	dd	d			
A.AL	k	k	kk	d			
A.TL	s	k	kk	d			

СКЛ	Количество экспериментов	Отношение (экспер./контр.)		Достоверность различия			
		среднее	диапазон	n/g ^a	<0,05	<0,01	<0,001
A.QR(B10.A) _m	4	1,49	0,82—2,21	2	2	—	—
B10.A.(AQR) _m	4	1,35	0,79—1,99	3	1	—	—
A.AL(A.TL) _m	1	0,63	—	—	1	—	—
A.TL(A.AL) _m	1	1,97	—	1	—	—	—

^a Недостоверно.

Эти линии различаются также по слабым H-локусам. Они различаются по H-2K и тождественны по I_g, Ss—Slp и H-2D. Стимуляция опять-таки относительно слабая. В табл. 37 отношение стимуляции в среднем составляет от 1,4 до 1,5 и все величины p либо недостоверны, либо немного ниже 0,05. Если тестировать клетки A.AL клетками A.TL (табл. 37), то отношения стимуляции будут очень низки и разница с контролем окажется недостоверной или едва достоверной. Таким образом, при различиях только по H-2K стимуляция очень слаба.

В табл. 38 приведены результаты для линий, идентичных по серологически определяемым локусам, т. е. B10.A (2R) с B10.A(4R), у которых ло-

ТАБЛИЦА 38

Тесты СКЛ с лимфоцитами с идентичными серологически определяемыми антигенами

	H-2K	I _r -1	Ss-Slp	H-2D			
B10.A(2R)	k	k	dd	b			
B10.A(4R)	k	k	bb	b			

СКЛ	Количество экспериментов	Отношение экспер./контр.		Достоверность различия			
		среднее	диапазон	n/g ^a	<0,05	<0,01	<0,001
2R(4R) _m	4	1,40	0,92—1,75	3	—	1	—
4R(2R) _m	4	2,58	1,67—3,75	—	1	—	3

^a Недостоверно.

кусы H-2K и H-2D идентичны. Единственное различие между этими двумя конгенными линиями должно находиться между H-2K и H-2D, мыши 2R и 4R различаются по Iг-Ig, как указывает Lieberman. Тот факт, что обе линии обозначаются буквой K, в Iг-1 не учитывает новейшей информации, полученной Lieberman о том, что они различны по Iг-Ig. Мыши 2R и 4R различаются также по SIp. В табл. 38 показан ответ клеток 2R на клетки 4R. В четырех различных опытах отношение стимуляции было низким, в трех из них разница была недостоверна и в одном достоверна при величине р меньше 0,01. Однако в противоположном направлении при ответе клеток 4R на клетки 2R_m, несмотря на идентичность по H-2K и H-2D, отношение стимуляции составило 2,6, в 3 опытах стимуляция была высокодостоверной и в одном опыте достоверность ее была пограничной. Это первый пример стимуляции в одном направлении между клетками с идентичными серологически определяемыми локусами.

В табл. 39 приведен последний пример этого явления, о котором я говорил. Здесь взяты линии с идентичными серологически определяемыми локу-

ТАБЛИЦА 39
Тесты СКЛ с лимфоцитами с идентичными серологически определяемыми антигенами

	H-2K	Iг-1	Ss-SIp	H-2D			
	q	k	dd	d			
AQR	q	k	dd	d			
B10. T(6R)	q	q	qq	d			
B10. A	k	k	dd	d			

СКЛ	Количество экспериментов	Отношение exper./контр.		Достоверность различия			
		среднее	диапазон	h/g ^a	<0,05	<0,01	<0,001
AQR(6R) _m	3	4,98	3,20—9,00	—	—	—	3
6R(AQR) _m	3	6,55	2,75—12,84	—	—	1	2
AQR(B10.A) _m	4	1,49	0,82—2,21	2	2	—	—
B10.A(AQR) _m	4	1,35	0,79—1,99	3	1	—	—

^a Недостоверно.

сами H-2K и H-2D, но различиями по Iг-1 и Ss—SIp. Обратимся прежде всего к результатам опыта с мышами AQR и B10.T(6R). Две эти линии явно стимулируют друг друга. Среднее отношение стимуляции равно 5 и 6,5. Все величины р высокодостоверны. Однако различия у этих линий находятся только между D и K в главной системе гистосовместимости. К сожалению, эти линии различаются также по слабым локусам. Можно доказать, что эту весьма выраженную стимуляцию определяют не малые локусы. Сравним комбинацию AQR с B10.A и с B10.T (6R). Две последние линии имеют одни и те же слабые локусы. Таким образом, ответ AQR на B10.A, если бы стимуляция клетками B10.T (6R) была обусловлена слабыми локусам, так же должен был бы быть сильным. В табл. 39 мы видим, что ответ AQR на B10.A даже при различии по H-2K плюс различие по малым локусам очень слабый. Следовательно, сильную реактивность между AQR и B10.T (6R) следует объяснить генетическими различиями, которые картируются между серологически определяемыми локусам, т. е. различиями, «определяемыми лимфоцитами».

ТАБЛИЦА 40

Ответ в СКЛ лимфоцитов мышей В10.А(2R) на стимуляцию клетками различных конгенных линий

Стимулирующие клетки	K	Ig-1	Ss	Slp	D	Отношение
В10.Г	q	q	q	q	q	5,93
В10	b	b	b	b		5,81
В10.А(3R)	b	b			d	9,71
В10.А(4R)			b	b		1,75
В10.Вг			k	k		1,89
В10.А						1,74
НТГ	d	d				8,59
АQR	q					3,14

В табл. 40 дана сводка дальнейших данных, поддерживающих наш общий вывод. Здесь показан ответ клеток В10.А (2R) на различные стимулирующие клетки. В таблице указаны генетические области, по которым отвечающие клетки отличаются от стимулирующих клеток. Из этой таблицы мы видим, что там, где имеются различия по Ig-1, «отношение стимуляции» равно 6 и выше, там, где различий по Ig-1 нет, отношение в трех случаях ниже 2 и в одном случае равно 3,14.

На основании этих опытов сложилось впечатление, что сильная стимуляция связана с различиями, которые локализуются в локусе Ig-1. Следовательно, возможно существует ряд различий между Н-2К и Н-2D, которые можно выявить в СКЛ, но которые очень трудно обнаружить серологически. Эта мысль показана в виде схемы на рис. 30. Надеюсь, что Kleip выскажется о некоторых собранных им данных. Мне кажется, что опыты с рекомбинантами доказали, что различия LD картируются в Ig-1. Можно допустить, что продукт Ig по существу является распознающей молекулой на отвечающих клетках в СКЛ, но, кроме того, продукт Ig может действовать как стимулирующая молекула, на клетках обработанных митомицином С — молекула, которая распознается лимфоцитом как чужеродная и в ответ на которую лимфоциты пролиферируют. Конечно, те продукты, гены которых картируются в локусе Ig, не обязательно являются идентичными. LD-локусы, упомянутые мной, могут быть разными генами. Мы получили указание, что некоторые из этих локусов можно генетически отделить от серологически определяемых локусов. Я хотел бы подчеркнуть, что, хотя различия LD трудно обнаружить серологически при помощи обычных цитотоксических тестов, возможно, удастся доказать, что антисыворотки, полученные у мышей АQR против В10.Т(6R), специфически блокируют стимуляцию в СКЛ. Кроме того, мы не исключаем возможности, что у мыши имеются LD-локусы слева от Н-2К, как и у человека, согласно нашему предположению. Вместе с тем мы пока еще не знаем, существуют ли у человека локусы LD между FOUR и LA.

Мы не знаем также играют ли какую-либо роль в активации СКЛ серологически определяемые антигены. Различия по концам Н-2К и Н-2D, которые вызывают значительную стимуляцию, можно объяснить по-разному, в частности, можно допустить, что серологически определяемые антигены локусов Н-2D и Н-2К сами стимулируют в СКЛ или, что, наряду с LD-локусами между Н-2К и Ss существуют также LD-локусы между Ss и Н-2D. Возможно, что те различия по Н-2D, которые сопровождаются также различиями по LD-локусам, стимулируют подобно Н-2К. У нас нет решающих

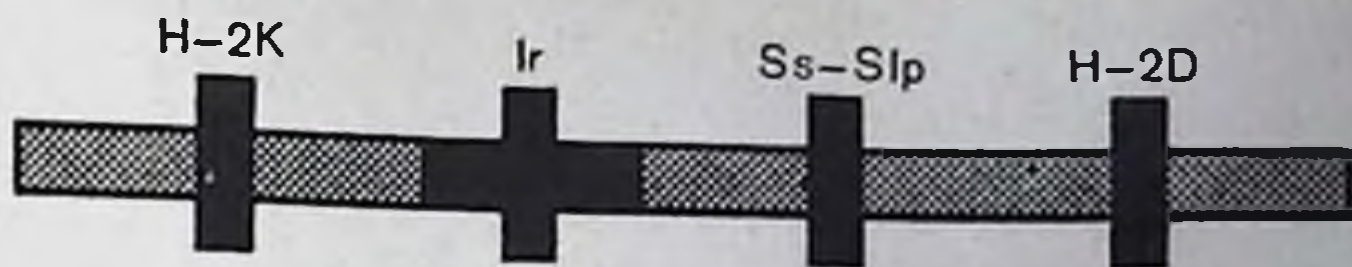


Рис. 30. Карта главного комплекса гистосовместимости мыши. Обозначены 4 области этого комплекса. Область вокруг Ir интенсивно окрашена, так как в этой области располагается известный LD-локус. Остальная часть этой хромосомы окрашена, так как, по-видимому, в этих областях находятся генетические различия, которые ведут к активации в СКЛ.

доказательств того или другого. Я хотел бы вкратце упомянуть один момент, который, как я надеюсь, будет обсуждаться позднее. У человека, по-видимому, существует некая корреляция между серологически определяемыми антигенами и способностью к ответу в СКЛ. Таким образом, мы вынуждены предположить либо, что серологически определяемые антигены FOUR и LA (и возможно H-2K и H-2D) играют какую-то роль, вызывая прямую активацию в СКЛ, либо что нарушения отклонения от неравновесного сцепления позволяют прогнозировать реакцию в СКЛ путем типирования по серологически определяемым антигенам.

Benacerraf. Я хотел бы спросить *Vach*, приживаются ли кожные трансплантаты на неопределенно долгое время у мышей, положительных по СКЛ, но идентичных по локусам K и D.

Vach. В некоторых случаях мыши, положительные по СКЛ и идентичные по локусам H-2K и H-2D, отторгают кожу и довольно быстро. Однако в одном случае с комбинацией B10.A(2R) и B10.(4R) наблюдалась односторонняя стимуляция в СКЛ, серологическое тождество по H-2K и H-2D и кожные трансплантаты не отторгались.

Председатель McDevitt. Предоставим слово *Shreffler*, у которого есть данные по этому вопросу.

Shreffler. Я хотел бы сообщить здесь новые данные, которые также говорят о стимуляции в СКЛ в комбинации, различающейся только по участкам Ir и Ss. Эти опыты были проведены вместе с *Meo*, *Vives*, *Miggiano* и *Serpellini* в Базельском институте иммунологии. В табл. 41 приведены наши результаты, полученные с конгенными линиями A.TH и A.TL. Мы работали с культурами клеток лимфатических узлов. В таблице указана степень стимуляции в количестве импульсов в минуту, индексы стимуляции и статистическая достоверность разницы между ними, вычисленная при помощи t-теста. Над показателем радиоактивности указаны области, по которым в каждой комбинации различаются отвечающие клетки и стимулирующие клетки. Прежде всего при различиях только по Ss (комбинация A—A.AL) стимуляция довольно слабая, но все же достоверная. В противоположном направлении стимуляции практически нет. При различиях по K плюс Ss (комбинация A и A.TL) мы наблюдали слабую недостоверную стимуляцию, но, если различия касались также Ir (A и A.TH), стимуляция была значительной и достоверной. При различиях только по K стимуляция была слабой или практически отсутствовала (A.AL и A.TL).

При различиях по D (A.TH и B10.S) стимуляции нет. В случаях несовместимости по K + D (B10.AKM и A.TL) стимуляция быть может не много сильнее, но разница недостоверна. Во всех случаях с различиями по Ir, с другой стороны, мы наблюдали достоверную и относительно сильную стимуляцию. Главное в этих данных то, что в комбинации A.TH—A.TL при различиях по Ir и Ss без различий по K и D двусторонняя стимуляция вполне достоверна.

ТАБЛИЦА 41

Результаты СКЛ между конгенными линиями, отличающимися по определенным областям H-2-комплекса

Отвечающие клетки	Стимулирующие клетки					
	A	A.AL	A.TH	A.TL	B10.S	B10.AKM
A	1500	Ss 3300 2,2 ^b	K, Ir, Ss 11900 7,9 ^b	K, Ss 3000 2,0		
A.AL	Ss 4200 0,9	4400	K, Ir, Ss 13400 3,0 ^b	K 5200 1,2		
A.TH	K, Ir, Ss 44900 2,6 ^b	K, Ir, Ss 58400 3,4 ^b	16800 —	Ir, Ss 42100 2,5 ^b	D 22500	
A.TL	K, Ss 1100 1,5	K 1100 1,5	Ir, Ss 4700 6,7 ^b	700 —		
B10.S	K, Ir, Ss, D 63700 3,5		D 12900 0,7	Ir, Ss, D 45800 2,5 ^a	17800 —	
B10.AKM				K, D 1100 2,2		500 —

^a p < 0,05.

^b p < 0,01.

^b p < 0,001.

Таким образом, как наши данные, так и данные Bach означают, что область Ir играет очень важную роль в реакции СКЛ независимо от каких-либо различий по серологически определяемым антигенам, которые ведут лишь к слабой стимуляции.

Председатель McDevitt. Мне кажется, я мог бы подытожить все сказанное в следующих словах: данные, приведенные этими тремя докладчиками, говорят о том, что комплекс H-2 включает локус K, ряд Ir-генов, локус Ss и локус D, а также гены, контролирующие стимуляцию в СКЛ, которые, видимо, картируются в области Ir-1.

Bach охарактеризовал K, D, Ss, ряд Ir-генов в «левой центральной области» и привел доказательства того, что участки, контролирующие СКЛ,

находятся там же, где и Iг-гены. Но что может сказать нам Bach о К и D? Могут ли они также стимулировать реакцию СКЛ?

Bach. Большинство различий по H-2D действительно дают слабую стимуляцию. Мне кажется, я привел некоторые типичные примеры. При повторных тестах в некоторых случаях стимуляция воспроизводилась. Изолированные различия по H-2K вызывают слабую стимуляцию, однако мы предъявили лишь одно — два таких различия и причем одно из них мы исследовали только один раз. Я хочу вновь подчеркнуть, что мы не знаем, что именно стимулирует реакцию в СКЛ — продукты H-2K или H-2D или продукты LD, тесно сцепленные с этими локусами.

Председатель McDevitt. К тому же мы располагаем данными Green о том, что антисыворотки к антигенам гистосовместимости у морской свинки избирательно блокируют функции генов специфического иммунного ответа, сцепленных с гистосовместимостью у гетерозигот F₁. Таким образом, возникает ряд вопросов о соотношениях между серологически определенными антигенами гистосовместимости, генами СКЛ, генами Iг и антигенами отторжения трансплантата. В частности, если существуют такие комбинации линий, которые различаются только по Iг и в СКЛ, но идентичны по серологически определенным антигенам гистосовместимости и совместимы при пересадке кожи, то тогда мы должны изучить соотношение между Iг-генами и генами СКЛ и установить, несут ли они сходные, но различные функции или же их эффект зависит от одних и тех же продуктов. У нас по этому вопросу немного информации. В той области картируются Iг-гены, которые, видимо, контролируют распознавание специфических антигенных детерминант. По-видимому, этот участок также ответствен за антигены клеточной поверхности, дающие наиболее сильную стимуляцию в СКЛ. Для меня не ясно, обусловлен ли этот тип стимуляции продуктами Iг-гена или же две эти функции принадлежат разным локусам в одном и том же участке хромосомы. Сейчас быть может целесообразно привести здесь данные о комбинациях линий, которые различаются только по Iг, но совместимы при пересадке кожи. В этом отношении наиболее интересны рекомбинанты В10.А (2R) и В10.А(4R), которые различаются по Iг-генам, контролирующим иммунный ответ на аллотипы иммуноглобулинов, дают стимуляцию в одном направлении в СКЛ, но гистосовместимы.

Bach. Я полагаю, что в первую очередь представляет интерес, поскольку мы располагаем соответствующими данными, мутант Bailey, возникший в результате точковой мутации слева от Ss. При сравнении с исходной линией наблюдается реципрокное отторжение трансплантата и реципрокная стимуляция в СКЛ. Во-вторых, комбинация 2R—4R, в которой наблюдается сильная стимуляция в одном направлении (явление очень редкое) и в которой кожные трансплантаты не отторгаются. В-третьих, комбинация В10.Т (6R) и АQR, в которой (несмотря на различия по слабым Hг-локусам), как доказала Klein, кожные трансплантаты отторгаются ввиду различий по главной системе гистосовместимости и происходит взаимная стимуляция в СКЛ. Надеюсь, что Klein расскажет нам об этих исследованиях.

Председатель McDevitt. Может быть, сейчас было бы уместно, если бы Lieberman познакомила нас со своими данными о различиях по генам иммунного ответа между В10.А(2R) и В10.А(4R). Эта комбинация линий, видимо, идентична по локусам К, Iг-1, Ss и D, но различается по локусам Iг-Iг и некоторым антигенам СКЛ.

Lieberman. Я хотела бы рассказать здесь о совместном исследовании, в котором участвовали Poul, Stimpfling, Humphrey и я. Один из вопросов,

которым мы задались, заключался в следующем: является ли Iг-1 одиночным локусом с множественными аллелями? Мне кажется, наши наблюдения по двум Iг-генам, каждый из которых контролирует иммунный ответ на определенный аллотип иммуноглобулина, показывают, что существуют по крайней мере два отдельных Iг-локуса. Если рассматривать наши данные, учитывая данные McDevitt и Chintz по Iг-1, то, видимо, существуют три разных Iг-гена.

Прежде мы сообщали, что иммунный ответ на а-аллотип IгА у мышей находится под контролем гена, сцепленного с H-2 и называемого Iг-IгА. Предварительное картирование гена Iг-IгА показало, что он связан с областью К, подобно Iг-1. Мы не смогли установить его точную локализацию между Ss и К, как это сделал McDevitt, но связали его со специфичностями области К. Возможно, что ген Iг-IгА находится слева от К или где-то в самой области К. С тех пор мы изучили другой ген иммунного ответа, контролирующей иммунный ответ на а-аллотип иммуноглобулина другого класса, т. е. IгG(γ_2a) на миеломных белках мышей BALB/c. Интересно, что ген Iг-IгG связан с другими гаплотипами H-2, чем ген Iг-IгА. Аллель сильного ответа Iг-IгА связан с H-2^a, тогда как аллель сильного ответа Iг-IгG связан с H-2^b. Таким образом, благодаря сцеплению двух разных аллелей сильного ответа с двумя разными гаплотипами H-2 мы смогли изучить рекомбинанты H-2^a/H-2^b для того, чтобы определить связь гена Iг-IгА с геном Iг-IгG в комплексе H-2. В табл. 42 перечислены конгенные линии, иммунизированные γ_2a миеломными белками, выделенными от мышей BALB/c. Иммуноглобулины перечисленных линий не имеют а-аллотипических детерминантов, которые присутствуют на использованном для иммунизации миеломном белке BALB/c. Таким образом, единственная разница между линиями была по типу H-2.

ТАБЛИЦА 42

Иммунный ответ конгенных с В10 линий на миеломный белок (М 173) IгG(γ_2a) BALB/c

H-2	Линия	Количество мышей	log ₂ Титр гемагглютининов	
			идио	алло
a	B10.A	9	2,88	2,77
b	B10	15	7,28	6,83
bc	B10.129 (6M)	10	9,12	6,75
d	B10.D2	10	1,20	1,20
k	B10.BR	8	2,00	2,00
p	B10.P	6	11,33	8,66

Антисыворотка реагировала со специфическим миеломным белком, использованным для иммунизации, и может идентифицировать и идиотипические миеломные детерминанты, находящиеся на Fab-фрагменте, и аллотипические детерминанты, присутствующие в константной тяжелой цепи.

Ни у одной линии не обнаружено каких-либо известных IгG(γ_2a) аллотипических детерминант миеломного белкового IгG иммуногена линии BALB/c. Был использован метод гемагглютинации по Gold и Fudenberg («Immunol.», 1967, № 99, p. 859).

Как видно из табл. 42, наблюдается отчетливая связь между гаплотипом H-2 и способностью продуцировать иммунный ответ на миеломные белки γ_2a BALB/c. Гаплотипы H-2^b, H-2^{bc} и H-2^p дают сильный иммунный ответ как на идиотип, так и на а-аллотип, присутствующий на иммунизирующем

миеломном белке. Известно, что аллотипические детерминанты определяются константной областью тяжелой цепи. Идиотипические детерминанты, специфичные для миеломы, находятся на Fab-фрагменте.

В табл. 43 показаны гаплотипы H-2, связанные с геном I γ -IgG, контролирующим иммунный ответ на а-аллотип γ_{2a} (IgG), и с геном I γ -IgA,

ТАБЛИЦА 43

Гаплотипы H-2, связанные с генами I γ -IgG и I γ -IgA, контролирующими иммунный ответ на миеломные белки IgG (γ_{2a}) и IgA линии BALB/c

H-2	I γ G		I γ A	
	идно	алло	идно	алло
a	H	H	B	B
b	B	B	H	H
bc	B	B	H	H
d	H	H	H	H
k	H	H	B	B
m	HT	HT	C	H
p	B	B	B	C
q	H	H	H	H
r	B	B	B	B
s	B	B	B	C
v	B	B	H	H

Ответ: H — низкий, B — высокий, C — средний, HT — не тестировался. Антисыворотка реагировала с иммуногенами (M173 или M467) и может идентифицировать и аллотипические (CH), и идиотипические (Fab) детерминанты.

контролирующим иммунный ответ на миеломные γ A белки а-аллотипа. Ясно, что H-2^a детерминирует слабый иммунный ответ на а-аллотип γ_{2a} и сильный ответ на а-аллотип γ A. H-2^b детерминирует сильный ответ на а-аллотип γ G и слабый ответ на а-аллотип γ A. Надо подчеркнуть здесь также некоторые другие различия, так как позднее мы будем рассматривать гены I γ -1, т. е. I γ -(H, Г)-А--А и I γ -(Т, Г)-А--Л с точки зрения гаплотипов H-2, связанных с генами I γ -IgG и I γ -IgA.

Как помнят читатели, McDevitt доказал, что H-2^s связан со слабым ответом на (Т, Г)-А--Л, (H, Г)-А--Л, и (Ф, Г)-А--Л, однако в табл. 43 показано, что H-2^s связан с сильным ответом на миеломные белки γ G и γ A мышей BALB/c. H-2^p также отличается по иммунному ответу на эти белки от ответа, полученного McDevitt на (H, Г)-А--Л. Этот ответ был сильным как на миеломные белки γ G, так и на γ A мышей BALB/c и слабым на (H, Г)-А--Л. Таким образом, этот анализ выявил три гаплотипа (H-2^{p,r,s}), у которых наблюдалось несоответствие между иммунным ответом на миеломные белки а-аллотипа и многоцепочечные синтетические полипептиды.

На рис. 31 и табл. 44 показан иммунный ответ кроссинговеров между H-2^a и H-2^b, о которых говорилось на этой сессии. B10.A(1R), B10.A(2R), B10.A(4R) являются рекомбинантами типа H-2^h. Область K их хромосом происходит от H-2^a, а область D от H-2^b.

Различия между B10.A(4R), B10.A(1R) и B10.A(2R) относятся к Ss-Slp; B10.A(4R) несет Ss^hSlp, в то время как 1R и 2R — Ss^hSlp^a. Кроссинго-

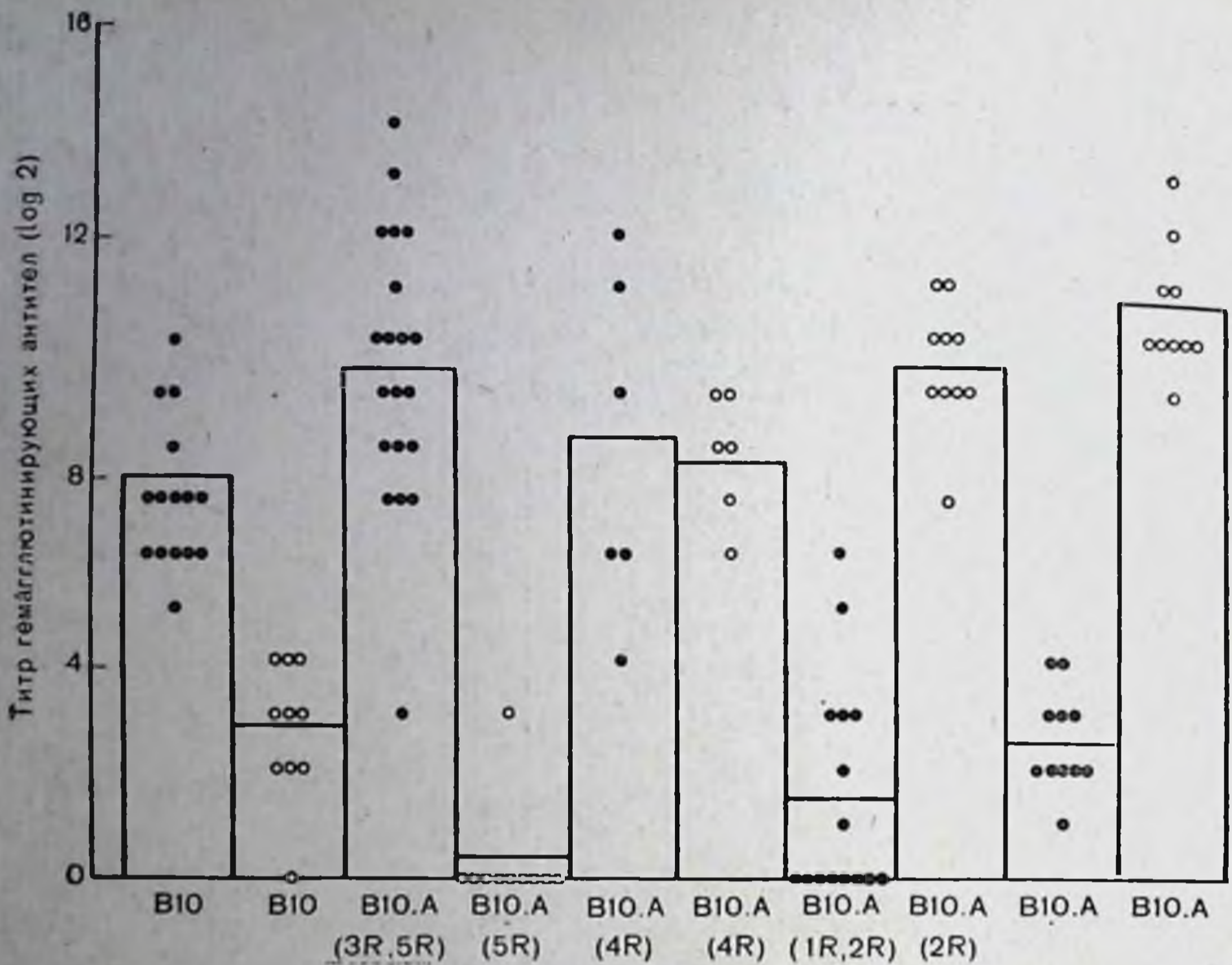


Рис. 31. Иммунный ответ у $H-2^a$, $H-2^b$ и $H-2^a/b$ рекомбинантов. Иммунный ответ мышей B10($H-2^b$), B10.A($H-2^a$) и $H-2^a/H-2^b$ рекомбинантов — B10.A (1R), B10.A(2R), B10.A(3R), B10.A(4R), B10.A(5R), на Ig (γ_{2a}) миеломный белок от BALB/c(1R и 2R объединяются, так как $H-2$ продукты пока неразличимы. То же относится и к 3R и 5R. Черные кружки указывают титр гемагглютинирующих антител к IgG миеломным белкам, светлые кружки — к IgA миеломным белкам, средняя геометрическая титра показана для каждой линии.

ТАБЛИЦА 44

Иммунный ответ рекомбинантных линий $H-2^a/H-2^b$ на миеломные белки IgG (γ_{2a}) и IgA (M467) мышей BalB/c

Линия	H-2	$\gamma G (\gamma_{2a})$			γA		
		кол-во мышей	гемагглютинины (log 2)		количество мышей	гемагглютинины (log 2)	
			идно	алло		идно	алло
B10	b	15	7,3	6,8	10	0,4	0,1
B10.A	a	9	2,9	2,7	8	10,8	2,0
рекомбинанты (1R) B10.A (2R) (3R)	h	20	2,3	0,4	10	9,5	2,0
B10.A(5R)	i	20	9,8	5,2	10	0,1	0,1
B10.A(4R)	h	6	8,3	1,6	6	7,8	3,2

Липидная соротка реагировала со специфическими миеломными белками, использованными для иммунизации, и может идентифицировать миеломные идиотипические (Fab), а также аллотипические (CH) белки.

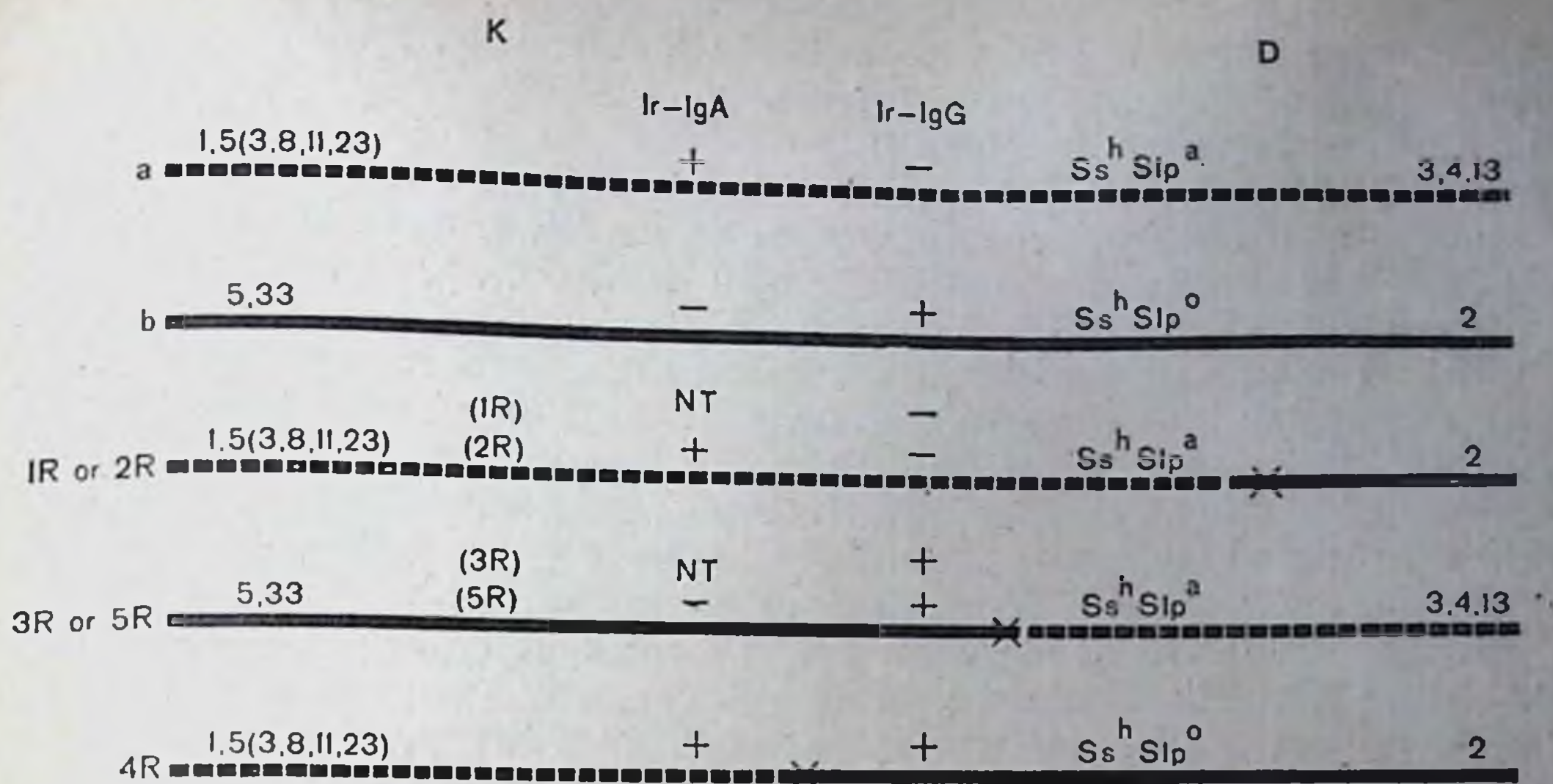


Рис. 32. Схематическое изображение хромосом В10.А (Н-2^а), В10.А(Н-2^б) и Н-2^а/Н-2^б кроссоверных хромосом В10.А. Область кроссинговера в каждой рекомбинантной хромосоме обозначена как X. Ранее было установлено, что хромосома В10.А (4R) образовалась в результате кроссинговера, произошедшего между Н-2К и генами Ss—Slp. Данные, приведенные в табл. 41, указывают, что кроссинговер разделяет Ig—IgА и Ig—IgG гены, которые находятся в этой области. Советуем читателю сравнить карту хромосом Н-2^а и Н-2^б, представленную на этом рисунке, с упрощенной версией в табл. 28 и в предисловии редакторов к этой сессии. В резюме Liberman использует пронумерованные антигенные специфичности, чтобы представить аллели Н-2К и Н-2D-локусов, которые присутствуют в этой хромосоме, и добавила обнаруженные локусы Ir-IgG и Ir-IgА.

вер прошел в разных участках хромосомы Н-2 этих рекомбинантов. У линии В10.А(4R) иммунный ответ на а-аллотип γ G был сильным, а у линии В10.А(1R) и В10.А(2R) — слабым. У всех этих линий К-конец хромосом происходит от Н-2^а. На рис. 31 показано, что линии В10.А(2R) и В10.А(5R) сильно отвечают на а-аллотип γ А (это показано белыми кружками). Таким образом, только рекомбинант В10.А(4R) давал сильный ответ на миеломные белки как γ G (черные кружки), так и γ А (белые кружки) аллотипа.

На рис. 32 показано строение хромосом рекомбинантов, упомянутых на рис. 31. Хромосомы Н-2^а представлены пунктирной линией, а Н-2^б сплошной линией. На хромосомных картах мы видим сцепление между геном Н-2К и генами Ig—IgА и Ig—IgG у этих рекомбинантных линий.

Линии В10.А(1R) и В10.А(2R) несут ген Н-2К от Н-2^а и характеризуются таким же ответом как В10.А(Н-2^б). Линии В10.А(3R) и 5R имеют ген Н-2К, от Н-2^б и дают такой же иммунный ответ на миеломные белки а-аллотипа IgG и IgА, как линия В10.СН-2^б. Исключением является иммунный ответ линии В10.А(4R). Она также имеет ген Н-2К от Н-2^а, поэтому можно было бы ожидать, что она должна сильно отвечать на а-аллотип IgА и слабо отвечать на а-аллотип IgG. Однако ответ на а-аллотипы IgА и IgG оказался сильным. Поэтому можно полагать, что кроссинговер, в результате которого образовался гаплотип Н-2 линии В10.А(4R), произошел между генами Ig—IgА и Ig—IgG. Мы считаем, что гены на хромосомах имеют следующий порядок: Ig—IgА, Ig—IgG слева от Ss—Slp, потому что это означает одиночный кроссинговер. Любой другой порядок предполагал бы двойной кроссинговер. Однако еще нельзя исключить двойной или неравный кроссинговер.

В общем я полагаю, что у нас имеются убедительные указания о наличии двух разных генов иммунного ответа.

Ваш установил, что линия 4R отличается по реактивности в СКЛ от линии В10.А(2R). Я полагаю, что это является дополнительным доказательством того, что участок хромосомы линии 4R, связанный со специфичностью области К, отличается от линии В10.А(2R).

Председатель McDevitt. Klein располагает данными о том, что существуют другие комбинации линий, которые имеют одни и те же локусы К и D, различаются по Ig-1 и по локусу (локусам) СКЛ и отторгают трансплантаты. Надеюсь, что Klein расскажет нам об этих данных, объединив эти взаимосвязанные функции, и даст нам какое-то представление о связях между генами, контролирующими серологически определяемые антигены H-2, антигены H-2, ответственные за отторжение трансплантатов, Ig-генами и СКЛ.

Klein. Ясно, что перед нами крайне сложная генетическая область, продукты которой можно обнаружить по крайней мере четырьмя разными методами: серологически, при помощи трансплантации, преимущественно при пересадках кожи, методами изучения генетики иммунного ответа и, наконец, при помощи методов активации лимфоцитов *in vitro* (СКЛ).

На основании серологических данных представляется ясным, что комплекс содержит минимум два гена H-2K и H-2D, которые контролируют два ряда антигенных специфичностей. Нельзя полностью исключить существование добавочных генов для серологически определяемых продуктов в комплексе H-2, но пока, видимо, есть все основания полагать, что существуют только два гена. Опыты с пересадкой кожи также указывают, по-видимому, на существование только двух локусов H-2K и H-2D, идентичных с локусами, которые контролируют серологически определяемые антигены. Любой из этих двух локусов может вызвать отторжение кожных трансплантатов. Опять-таки, хотя мы не можем полностью исключить существование других локусов гистосовместимости в комплексе H-2, все результаты опытов с пересадкой кожи соответствуют гипотезе о двух генах. Однако они не исключают возможности, что существуют H-гены, находящиеся вне комплекса H-2, но тесно сцепленные с этим комплексом.

Какова связь между серологически определяемыми антигенами H-2 и антигенами H-2, вызывающими отторжение кожных трансплантатов? В подавляющем большинстве случаев серологическая идентичность связана с постоянным выживанием кожного трансплантата, а серологическое различие — с отторжением кожного трансплантата. Однако есть исключения из этого правила. Одним из примеров служит мутант Bailey, который серологически не отличим от исходной линии, но тем не менее при обмене кожными трансплантатами между этими двумя линиями они отторгаются. Другим примером являются рекомбинантные линии В10.Т(6R) и АQR. Мы испытывали их с большим набором антисывороток H-2 и не нашли каких-либо серологических различий. Мы проводили также перекрестные иммунизации этих линий и не нашли антител. Однако ткани двух линий не совместимы. Это ясно из того, что у гибридов (В10 × АQR) F_1 кожные трансплантаты В10.Т(6R) отторгаются через 14—16 дней. Линия В10.7Т(6R) несет также маркеры вне комплекса H-2 (Т и *tf*), поэтому возможно, что в данном случае отторжение вызывается локусами, находящимися вне H-2.

Данные, полученные в СКЛ, по-видимому, говорят о том, что стимуляция может достигаться различиями почти в любой точке комплекса H-2 за исключением области Ss—Slp. Однако существуют резкие количественные различия в стимуляции, обусловленной разными областями комплекса H-2. Только H-2D или только H-2K обычно дают лишь слабую стимуляцию, но

область Ig дает очень сильный ответ. Очевидно, происходит также некоторое суммирование эффекта разных областей в том смысле, что различия по нескольким участкам дают более сильную стимуляцию, чем различия по одной области. Связь между стимуляцией в СКЛ и отторжением кожных трансплантатов пока не ясна. Однако, поскольку у нас есть хотя бы один доказанный случай стимуляции СКЛ, несмотря на постоянное выживание кожных трансплантатов, а именно: в сочетании линий В10.А(2R) и В10.А(4R), то, очевидно, можно заключить, что два эти феномена не зависят друг от друга.

При изучении Ig-генов у нас создается впечатление, что существует множество генов, локализованных преимущественно между локусами Ss—Slp и H-2K. Существование двух из них теперь уже твердо доказано, а именно: генов Ig-1 (McDevitt) и генов, обнаруженных Lieberman. Указания на существование добавочных Ig-генов в области H-2K неполны или косвенны. Следует все же помнить о возможности наличия Ig-генов между локусами Ss и H-2D или вне комплекса H-2. В общем, однако, по-видимому, Ig-гены сконцентрированы в том сегменте хромосомы, который вызывает наиболее сильную стимуляцию в тесте СКЛ.

На основании этих данных можно выдвинуть следующие предположения о том, что представляет собой комплекс H-2. Во-первых, можно предположить, что молекулы, которые обнаруживаются различными упомянутыми выше методами, имеют между собой очень мало общего — все они разные. Это представляется маловероятным ввиду тесной связи между эффектами разных продуктов. Во-вторых, допустим, что по крайней мере некоторые методы выявляют одни и те же продукты. Можно предположить, что серологические и трансплантационные методы выявляют продукт одного типа, а методы СКЛ и Ig выявляют продукт другого типа. Эта возможность поддерживается тем наблюдением, что линии, серологически идентичные и не отторгающие кожный трансплантат друг от друга, но различные по Ig генам, активируют также лимфоциты друг друга в СКЛ. Третья возможность состоит в том, что все гены комплекса H-2 детерминируют продукты одного и того же типа и различные проявления этих продуктов обусловлены только разницей в методике. Конечно, эта гипотеза предполагает, что гены H-2D и H-2K проявляются иначе, чем гены средней части комплекса H-2. Эта последняя гипотеза несомненно наиболее привлекательна, однако лишь будущие исследования покажут, какая трактовка верна. Я не сомневаюсь, что в ближайшем будущем будут получены косвенные данные в результате генетических и иммунологических исследований, которые будут поддерживать ту или другую трактовку. Я убежден также, что окончательный выбор между этими гипотезами можно будет сделать только тогда, когда будут выделены отдельные продукты генов комплекса H-2.

Председатель McDevitt. Выступление Klein открывает путь к некоторым замечаниям, которые хотел бы сделать Bodmer о популяционной генетике тесно сцепленных локусов.

Bodmer. Эта тема часто затрагивается в наших обсуждениях. Почему локусы с родственной функцией обычно находятся близко друг к другу и почему существуют ассоциации или связи между фенотипами, детерминированными сцепленными локусами? Популяционная генетика сцепленных локусов зародилась в 1930 г., когда Fisher впервые высказал свои соображения на эту тему. Возьмем общую модель, не имеющую отношения к генетическим обозначениям, о которых шла сегодня речь. Рассмотрим два сцепленных локуса, каждый из которых имеет два аллеля: А и а, В и в. Это локусы на одной и той же хромосоме. Они дают четыре генетические комбинации АВ Ab, аВ, ab. Можно отдельно рассматривать локус А-а и локус В-в и

попытаться установить, какова частота А по сравнению с а и В по сравнению с в популяцией.

Мы можем задаться вопросом (если обратиться к комбинации двух локусов), можно ли обнаружить ассоциацию между ними? Допустим, что частота $A = P$, $a = Q$, тогда $Q = 1 - P$, при частоте $B = P$ и частоте $b = q$ подобным же образом $q = 1 - p$.

Если два локуса не сцеплены, то частоты генетических комбинаций должны быть произведением соответствующих частот, т. е. для комбинаций АВ частота должна быть равна Pp , для комбинации Аb частота должна быть равна Pq , для комбинаций аВ — Qp , для комбинации аб — Qq .

По законам популяционной генетики обычно, если нет селекции, то какой бы ни была частота рекомбинации между этими двумя локусами в популяции со временем возникает эта полная независимость двух локусов. Иными словами, при равновесии существует принципиальная разница между ассоциацией локусов, обусловленной сцеплением в семьях (которая при тесном сцеплении должна быть почти полной, если частота рекомбинации мала), и ассоциацией на популяционном уровне, когда может совершенно отсутствовать какая-либо ассоциация между двумя локусами.

Можно доказать, что скорость, с которой достигается приближение к полной независимости двух генов, описывается функцией $(1-r)^t$, где t — время, а r — частота рекомбинации. Иными словами, в отсутствие селекции и при условии достаточного времени, как бы тесно не были сцеплены два локуса, их сцепление не проявится на популяционном уровне. Как же объяснить наличие тенденции к ассоциации на популяционном уровне между парами тесно сцепленных локусов?

Формальное объяснение заключается в том, что некоторые гаметные комбинации не подчиняются правилу, согласно которому их частота является произведением частот генов. Этот феномен называют неравновесным сцеплением.

Возьмем крайний случай. Если начать с популяции, содержащей только комбинации АВ и аб, то ассоциация между А и В и между а и в должна быть абсолютной, прежде чем появляются рекомбинантные типы. В дальнейшем в результате рекомбинации возникают хромосомы Ab и aB и частота их увеличивается; наконец, в отсутствие селекции, достигается их полная независимость. Таким образом, наличие ассоциации можно объяснить недостатком времени, прошедшего с тех пор, как возникла данная комбинация, для того, чтобы аллели двух локусов стали независимыми друг от друга. Иначе говоря, если данная комбинация возникла относительно недавно, то быть может просто не прошло достаточно времени для случайной рекомбинации с другими комбинациями, уже имеющимися в популяции.

Вы можете вспомнить, что на предыдущей сессии, после того, как выступил Вепасеггаф по ассоциации генов гистосовместимости с генами иммунного ответа у беспородных морских свинок, я задал вопрос: происходят ли эти беспородные морские свинки из большой или маленькой колонии производителей? Если бы они произошли от относительно малой колонии, то первоначально число генетических комбинаций данного Н-антигена с данным геном иммунного ответа возможно было весьма ограниченным. Допустим, например, что ген сильного ответа был на хромосоме, имеющей антиген 2, а ген слабого ответа — на хромосоме с антигеном 13. Возможно, еще не прошло достаточно времени, чтобы появилось достаточное количество рекомбинантов со слабым ответом на антиген 2 и сильным ответом на антиген 13. И, таким образом, поскольку мы исходим из малого числа генетических комбинаций среди беспородных животных, остается тенденция к ассоциа-

ции между фенотипами иммунного ответа и H-антигена. Если, однако, исходить из значительно большей колонии, в которой с самого начала можно ожидать в популяции, где долгое время происходило случайное скрещивание), то этой ассоциации не было бы. Иными словами, если начинать от ограниченного числа генетических комбинаций, которые не были независимы друг от друга в популяции производителей, то можно получить популяционную ассоциацию, обусловленную тесным сцеплением.

Разница между сцепленными локусами среди популяций и среди семей — это основная причина, почему генетика HL-A у человека развивалась совершенно иначе, чем генетика H-2 у мыши. Очень многие данные, полученные у человека, основаны на исследовании популяции, когда ассоциации приходится интерпретировать с точки зрения критериев популяционной генетики. С другой стороны, в опытах на мышах мы имеем ограниченное число генотипов, представленных имеющимися инбредными линиями, и у нас нет данных о всех возможных комбинациях.

Я думаю, что этот вопрос очень важен, так как он означает, что при наличии множества тесно сцепленных генов, как в комплексе H-2, так и HL-A, чем больше будет обнаружено генов, тем меньше вероятность, что какой-либо набор генотипов представляет собой случайную выборку всех возможных комбинаций. Таким образом, окажется большей вероятностью того, что в этом наборе будут найдены ассоциации, обусловленные теми комбинациями, которые были там с самого начала. По этим причинам надо очень осторожно сделать выводы, основанные на ассоциациях между данными фенотипами и генотипами у инбредных линий о наличии одного или нескольких специфических генов, контролирующих фенотипы. Прекрасным примером этого является выступление Lieberman. Она показала, как можно пытаться разделить функции, возможно, весьма тесно сцепленные, если рассматривать тщательно отобранные рекомбинантные генотипы.

Более общий вопрос состоит в том, почему существует область с многочисленными сцепленными генами, функции которых, видимо, родственные, что удерживает их вместе? Это связано с вопросом о том, почему в популяциях наблюдаются сцепленные локусы и даже после длительного времени в конечном счете гены не будут ассоциироваться в случайном порядке. В 1930 г. Fisher предположил, что если происходит селекция, благоприятная для определенных комбинаций генов, скажем AB и ab, по сравнению с другими комбинациями (Ab и aB), то может быть достигнуто состояние равновесия, при котором локусы уже не будут ассоциироваться в случайном порядке.

С 1930 г. появилось много работ по теоретической популяционной генетике, где исследовались условия, при которых равновесие не приводит к случайным комбинациям пары сцепленных локусов. Эти условия заключаются в том, что сила влияния селекции, а именно, тенденции к предпочтению определенных комбинаций, должна иметь порядок частоты рекомбинации или меньше. Это означает, что чем теснее сцепление между двумя генами, тем меньше селекционные преимущества, необходимые, чтобы удерживать их вместе. В популяционной генетике есть много примеров наборов генов у высших организмов, которые удерживаются вместе, очевидно, механизмом селекции. Все мы слышали термин «супергены», предложенный E. V. Ford. Мне не особенно нравится этот термин, так как он не имеет ясного смысла. Очевидно, имеется в виду группа генов, которая удерживается вместе, благодаря селекционному преимуществу, возникающему при их взаимодействии.

Мне кажется ясным, что гены HL-A и H-2 являются суперпримером супергена! Это набор генов с полностью взаимосвязанными функциями, который, очевидно, удерживается вместе в процессе эволюции механизмом селекции, благоприятным для комбинаций, взаимодействующих друг с другом.

Думаю, что это очень простой ответ на вопрос, ранее поднятый Lilly, о том, почему существует эта особая своеобразная генетическая структура с двумя очень сходными генами: D и K у мышей, LA и FOUR у человека, разделенными сотнями или даже тысячами других генов. Видимо, такой же сегмент хромосомы имеется у всех видов млекопитающих, причем этот комплекс удерживается как единое целое в течение всего процесса эволюции данного вида.

Естественно, как отмечали уже Shreffler и другие авторы, возникает мысль, что гомология между LA и FOUR и между D и K и вообще между этими наборами генов обусловлена последовательными этапами дупликаций. Этот механизм увеличения количества генетического материала хорошо известен и описан в классической генетике дрозофиллы.

Председатель McDevitt. Считает ли Bodmer, что Ig-гены в принципе то же самое, что K и D?

Bodmer. Предположение, высказанное McDevitt, несомненно, вполне допустимо. Возникает вопрос: что представляла собой первоначальная единица, которая подверглась дупликации? Возможно, это был один ген или небольшая группа генов, которая затем редуплицировалась. Тогда возникает вопрос: каково было соотношение между генами в этой первоначальной группе? Следует отметить, что существует два основных пути дупликации генетической информации в процессе эволюции.

Один путь, как я уже говорил, заключается в тандемной дупликации ограниченного участка в результате неравного кроссинговера. Другой общеизвестный механизм заключается в воспроизведении целых хромосом. Таким образом, в отношении гемоглобинов и, вероятно, также и иммуноглобулинов, когда с одной стороны имеются α -цепи, а с другой — β -, γ -, λ -, ϵ -цепи, взаимосвязанные между собой, можно допустить, что существовал первичный ген гемоглобиновых цепей и хромосома, несущая этот ген, подверглась дупликации. Один дубликат стал хромосомой, несущей ген α -цепи, а другой стал хромосомой, несущей гены β -цепи, которые в дальнейшем подверглись дифференцировке иной, чем ген α -цепи. С точки зрения эволюции можно предположить, что с одной стороны гены иммуноглобулинов, а с другой — H-гены происходят от общего набора предшественников, которые подверглись дупликации при дупликации хромосом. В дальнейшем они эволюционировали и приобрели разные функции. Вслед за Jerne и Wigdahl я высказал ранее предположение, что общее происхождение этих функций, особенно происхождение функций генов, сцепленных с H-генами, связано в более общем смысле с распознаванием клетки клеткой во время дифференцировки, которая несомненно предшествовала возникновению иммунного ответа в процессе эволюции.

Serpellini. Я хотел бы добавить несколько замечаний к этому ясному выступлению Bodmer. У человека известен другой пример неравновесного сцепления, связанный с иммунологией, когда равновесие нарушается между аллелями, кодирующими константную часть γ -цепей. Это область γ_1 ($Gm^a Gm^1$), γ_3 (Gm^b, Gm^3), γ_2, γ_4 . Указанная последовательность соответствует наиболее вероятной хромосомной карте по Kupke. Типы Gm в скобках означают аллели γ_1 и γ_3 , наиболее частые среди людей европейской расы. Тем не менее встречаются только две комбинации хромосом

(или гаплотипов): « $\gamma_1 Gm^a$; $\gamma_3 Gm^g$ » и « $\gamma_1 Gm^f$; $\gamma_3 Gm^b$ ». Гаплотипы « Gm^a ; Gm^b » и « Gm^f ; Gm^g » крайне редки в Европе. Правда, сцепление между γ_1 и γ_3 очень тесное (менее 10^{-4} процента рекомбинант), но этот полиморфизм весьма древний, так как шимпанзе имеет те же маркеры Gm , что и человек. Таким образом, за множество поколений прошло недостаточное время, чтобы достигнуть равновесия между всеми возможными гаплотипами. Поэтому мы можем считать, что в условиях Европы какое-то селективное преимущество благоприятно для наблюдаемых комбинаций гаплотипов.

По всей вероятности, селективное преимущество содействует также поддержанию тесного сцепления между генами, кодирующими тяжелые цепи. В этом случае мы можем найти хорошее объяснение: действительно, близкое соседство на хромосоме может быть одной из предпосылок для соединения разных V-генов с разными С-генами путем перестановок внутри хромосомы. Если соединение вариабельной и константной области происходит на уровне ДНК, то регионы области Ig должны действовать как интегрированные функциональные единицы, почти как «хромосомные органеллы».

Деление хромосом на функциональные единицы, состоящие из многих генов, вероятно является общим феноменом у высших организмов и может относиться также ко многим генам, входящим в основные системы гистосовместимости.

Herzenberg. Я хотел бы высказать здесь одну мысль, которую можно быстро разнести в клочки, но возможно она послужит стимулом для обсуждения. Хочу попытаться объяснить очень интересное наблюдение, что MLC и Ig находятся в одной и той же генетической области или являются одними и теми же генами и вопрос о том, проявляются ли Ig-гены на Т- или В-клетках.

Действительно, когда (Т, Г)-А--Л связывается с некоторыми В-клетками, а мы знаем, что это происходит, то возможно он распознается не как свободный антиген (Т, Г)-А--Л, а как новая детерминанта клеточного типа. Т-клетка, реагирующая с этим детерминантом, также как Ig-ген функционирует в качестве распознающей клеточной единицы, она распознает лимфоцит, имеющий генетически детерминированную иную конфигурацию поверхности. Теперь сложим эти два предположения: Т-клетки, несущие Ig-гены (что равнозначно MLC или LD, как выражается Bach), распознают другие клетки, имеющие иную конфигурацию клеточной поверхности, генетически детерминированную или детерминированную путем соединения с такими антигенами, как (Т, Г)-А--Л, хотя они не могут распознавать свободный (Т, Г)-А--Л.

Хочется сделать еще одно замечание. Таким же образом можно было бы интерпретировать еще один опыт, а именно: наблюдение Katz и Вепасеггаф (аллогенный эффект) и наблюдение Gmitel о том, что РТПХ превращает неответчающих особей в отвечающие. По существу, это лишь другой способ стимуляции Т-клеток, ведущий к дифференцировке В-клеток. После распознавания комплекса Т-клетками происходит образование факторов, которые могут стимулировать дифференцировку В-клеток в клетки, образующие антитела¹.

¹ Последующие высказывания Вгауп.

Когда обсуждалась роль Ig-генов, большое внимание уделялось их контролю специфических рецепторов для антигенов. Однако я хотел бы повторить, что эти гены наряду с контролем распознавания на уровне Т- и В-клеток могут регулировать решающее взаимодействие между хелперными Т-клетками и антигенореактивными В-клетками. Теперь у нас есть убедительное доказательство того, что для определяемой функции В-клеток, служащей критерием во всех экспериментах, которые здесь обсужда-

Wach. Я хотел бы вернуться к вопросу, ранее поставленному Вепасеггаф, об отторжении трансплантатов. Мне кажется, что это очень интересный вопрос. Согласен почти со всем, что сказал Klein, но все же хотелось бы сделать пару замечаний. Во-первых, в комбинации AQR—B10.T(6R) имеются различия между H-2K и H-2D, в СКЛ происходит стимуляция, отторгаются трансплантаты. Я вполне согласен с тем, что локус, контролирующий отторжение трансплантатов, может быть иным, чем локус, вызывающий активацию в СКЛ, но вместе с тем я полагаю возможным также, что локус между H-2K и H-2D, контролирующей активацию в СКЛ, контролирует также отторжение трансплантата.

Все мы заинтересованы наблюдением Simonsen, который отметил очень высокую частоту отвечающих клеток в системе РТПХ и аналогичным наблюдением в СКЛ. По-видимому, на данном этапе мы можем сказать, что это наблюдение не столь уже удивительно, так как теперь мы не имеем ни малейшего представления о количестве разных структур, распознаваемых на одной аллогенной клетке и у нас очень неясные представления о том, сколько существует локусов LD.

В ответ на вопрос Вепасеггаф чрезвычайно важно было бы установить, имеется ли в тех условиях, в которых наступает лимфоцитарный ответ *in vitro*, также соответствующий лимфоцитарный ответ *in vivo*, как, например, РТПХ. Сейчас мы пытаемся проверить это предположение.

Wodmer. Я хотел бы сделать еще два замечания. Во-первых, я считаю, что пример с использованием морских свинок очень удачный, так как он характеризует «переход» от мыши к человеку. Мышь занимает самое «верхнее место», с полной ассоциацией между иммунным ответом и H-антигенами, а человек — «нижнее место», очень мало отличающееся от случайной ассоциации в большой популяции.

Другое замечание касается кажущегося противоречия между данными о позиции локуса MLC у мыши и у человека. Как пояснил Wach, существование сибсов, идентичных по HL-A, которые дают стимуляцию в СКЛ, позволяют предположить, что локус MLC находится вне участка FOUR—LA, тогда как изучение карты H-2 указывает на наличие ряда генов между K и D, контролирующих ответ в СКЛ.

Я хотел бы высказать здесь мнение, что эта разница скорее кажущаяся, чем реальная. Она обусловлена методиками, с помощью которых отбираются разные типы рекомбинантов. У человека мы вынуждены иметь дело с комбинацией четырех разных хромосом. Затем мы имеем потомство, идентичное по HL-A, но различающееся по ответам в СКЛ. У мышей мы тщательно контролируем генетическую ситуацию и можем производить возвратное

ются, нужны два сигнала для В-клетки: первый, специфический антигенный сигнал, второй — для активации опосредованной АМФ системы усиления. В другой работе я рассматривал доказательство того, что второй сигнал может быть обеспечен взаимодействием антигенно-реактивных В-клеток с активированными антигеном Т-клетками. Ранее я говорил о данных, показывающих, что эти взаимодействия, если они вызывают избыточную стимуляцию системы АМФ в В-клетках, могут подавить функции В-клеток. Недостаточная стимуляция системы усиления в В-клетках может также привести к тому, что заметной функции В-клеток не будет.

Таким образом, перед нами стоит вопрос: в какой мере слабые и сильные ответы могут объясняться влиянием Ig-генов на обязательную систему усиления? Факт, что различные антигены могут запустить сильный или слабый ответ у животных данного генотипа, является отражением того, в какой мере данный антиген, взаимодействующий с соответствующим рецептором, способен повлиять на регулярную систему АМФ. Таким образом, вполне возможно, что генетический контроль, связанный с Ig-генами, может действовать не только на уровне специфического распознавания антигенов, но также и на менее специфическом уровне регуляции ответа В-клеток.

скрещивание данной гетерозиготы и отбирать рекомбинантов прежде всего по серологическим различиям, а затем пытаться выяснить, различаются ли они по MLC. Я не думаю, что у человека можно было бы обнаружить различия по MLC, которые могли бы контролироваться генами между LA и FOUR на основании изучения сибсов, идентичных по HL-A. Для аналогичного исследования на мышах, мне кажется, надо было бы скрестить два гибрида F₁, получить серологически идентичное потомство и попытаться установить, есть ли среди этого потомства животные, идентичные серологически, но различающиеся по MLC. Точно так же у человека надо было бы более внимательно исследовать рекомбинантов между локусами, выявляемыми серологически, чтобы установить, как они взаимодействуют в СКЛ (van Rood располагает некоторыми данными по этому вопросу, с которыми было бы интересно познакомиться). Я полагаю, что тогда мы вновь убедимся, что генетическая организация двух систем H-2 и HL-A аналогична.

Председатель McDevitt. Я просил van Rood представить его данные.

Van Rood. Я хотел бы остановиться на четырех темах, обсуждавшихся на этой сессии: 1) локализация локуса MLC; 2) эффективность серотипирования по LA и FOUR для прогнозирования реактивности в СКЛ; 3) отношение локуса MLC к клеточному иммунному ответу *in vivo*, т. е. к отторжению кожного трансплантата; 4) серологическое распознавание локуса MLC. Для того чтобы подойти к этим темам, расскажу о семье, которую мы изучали в Амстердаме вместе с Eijsvogel. Это семья KA, которая была необычной, так как у двух сибсов произошло два разных кроссинговера; таким образом, в семье было шесть различных хромосом. В табл. 45 приведены данные по комплексу HL-A. Последний ребенок имел кроссинговер между FOUR и LA. В табл. 46 показаны некоторые результаты теста СКЛ. Исследовался ребенок с кроссинговером между локусами FOUR и LA и сибсы, несущие гаплотипы bc и гаплотипы ac. По серии LA имеются различия, но тимидин фактически не включается. При различиях по серии FOUR наблюдалась значительная стимуляция. Таким образом, это подтверждают данные ряда исследователей, которые также нашли, что стимуляция в СКЛ связана с антигенами серии FOUR и не связана или связана лишь минимально с серией LA.

В табл. 47 показаны данные, полученные в СКЛ с другими сибсами, у которых не было кроссинговеров между LA и FOUR. Два сибса, идентичных по HL-A, несли гаплотипы b и c, и, как и следовало ожидать, взаимной стимуляции не было. У трех сибсов были гаплотипы b и d (сибсы № 3, 4 и 5),

ТАБЛИЦА 45

Результаты HL-A типирования и гаплотипы семьи KA

Отец	2-8/11-W5	ab
Мать	3-7/1-8	cd
Ребенок		
1	11-W5/3-7	bc
2	11-W5/3-7	bc
3	11-W5/1-8	bd
4	11-W5/1-8	bd
5	11-W5/1-8	bd
6	2-8/1-8	ad
7	2-8/1-8	ad
8	2-8/1-8	ac
9	2-8/3-7	ac
10	2-W5/3-7	a/bc

ТАБЛИЦА 46

СКЛ с участием рекомбинантов между LA и FOUR в семье KA^a

Различия HL-A	Сибсы	имп/мин
Только 1-я серия a/bc + bc	10+1	62
	10+2	63
Только 2-я серия: a/bc + ac	10+8	3,035
	10+9	11,069

^aРезультаты однонаправленной реакции.

ТАБЛИЦА 47

Двунаправленная СКЛ с участием сибсов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 семьи KA

Комбинации генотипа HL-A	Сибс	имп/мин
bc + bc bd + bd	1+2	33
	4+5	37
bc + bd	4+3	2124
	5+3	3982
	1+4	1969
	2+4	1655
	1+5	2108
	2+5	3078
	1+3	122
a/bc + bd	2+3	105
	10+3	353
	10+4	2452
	10+5	2394
ad + ad	6+7	117
ac + ac	8+9	167

и, как и следовало ожидать, между № 4 и № 5 взаимной стимуляции не было. Возможно, это объясняется кроссинговером между локусом MLC и локусом FOUR.

Eijsvogel имел возможность исследовать сибса № 3 с предполагаемым кроссинговером между MLC и FOUR и сибса с кроссинговером между FOUR и LA. Стимуляции фактически не было, несмотря на различия по трем антигенам HL-A. На этом основании я считаю, что мы можем определить положение локуса MLC слева от локуса FOUR. Если бы он находился справа, пришлось бы допустить двойной кроссинговер. Это допущение возможно, но весьма маловероятно. Это один из доводов. К тому же выводу пришли Vach и Eijsvogel, поскольку стимуляции в СКЛ между сибсами, идентичными по HL-A, встречается с той же частотой, что кроссинговер между LA и FOUR. Если допустить, что эта стимуляция обусловлена кроссинговером, произошедшим между MLC и FOUR, то очевидно, что если бы локус MLC находился справа от локуса FOUR, то он располагался бы близ локуса LA; другие данные не поддерживают последнее предположение. Таким образом, на основании данных, полученных в описанной мною семье, и данных, со-

бранных во всем мире, мы полагаем, что локус MLC у человека находится слева от FOUR. Затем возникает вопрос: в какой мере мы можем предсказать результат в СКЛ, если типлируем индивидов серологически только по LA и FOUR? Этот вопрос поднял также Bodmer. Ответом служит табл. 48. В этой серии из 26 комбинаций, идентичных по HL-A неродственных индивидов, только у трех клетки не стимулировались в СКЛ. Это составляет около 10%. Сейчас мы исследовали более 100 комбинаций и эта частота по-прежнему остается между 10 и 20%. В случаях отрицательного результата стимуляция столь же слабая, как у сибсов, идентичных по HL-A. Стимуляция в СКЛ неродственных индивидуумов, идентичных по HL-A, в общем слабее, чем у «несоответственно» подобранных лиц, как отмечали Sorensen, Bach и др.

ТАБЛИЦА 48

СКЛ между неродственными индивидуумами, идентичными по HL-A

Фенотип	Кол-во неродственных индивидуумов	Кол-во исследованных комбинаций	СКЛ — отрицательная	
			СКЛ — всего	
1,3	7,8	7	14	3/14
1,2	7,8	4	6	0/6
1,2	8,12	3	3	0/3
2,3	7,w15	2	1	0/1
2,3	7,12	2	1	0/1
1,9	8,12	2	1	0/1
		<u>20</u>	<u>26</u>	<u>3/26</u>

Таким образом, если типировать серологически только по LA и FOUR, то лишь в 10—20% случаев можно дать правильный прогноз в отношении локуса MLC. Я полагаю, этот вопрос очень важен в отношении корреляции между серотипированием по HL-A и болезнями. Для того чтобы изучить проблему связи выживаемости кожных трансплантатов и реактивности в СКЛ, мы серотипировали по LA и FOUR и определяли реактивность в СКЛ. На рис. 33 реактивность в СКЛ выражена как индекс стимуляции таким же образом, как у Bach. Ранее мы опубликовали результаты одного большого опыта, в котором не найдено корреляции между реактивностью в СКЛ и выживаемостью кожных трансплантатов. Теперь мы продолжили исследования и убедились в том, что корреляция существует, хотя быть может и не слишком внушительная. На этом графике есть несколько обозначений. Темные кружки с одним наружным кругом или двумя наружными кругами означают реципиентов, получивших только два или три кожных трансплантата. Между этими реципиентами корреляция реактивности в СКЛ и выживаемостью кожных трансплантатов не слишком выражена. Перечеркнутый черный кружок означает реципиентов, получивших только один кожный трансплантат и согласно предварительным данным у них корреляция между стимуляцией в СКЛ и выживаемостью кожных трансплантатов значительно более выражена.

Наконец, на этой сессии несколько раз поднимался вопрос о том, можно ли распознать серологически продукт локуса MLC. Сейчас мы ставим опыт, основанный на наблюдениях Serpellini. Дело в том, что нам нужны неродственные индивиды, идентичные по HL-A и различающиеся по MLC. Если

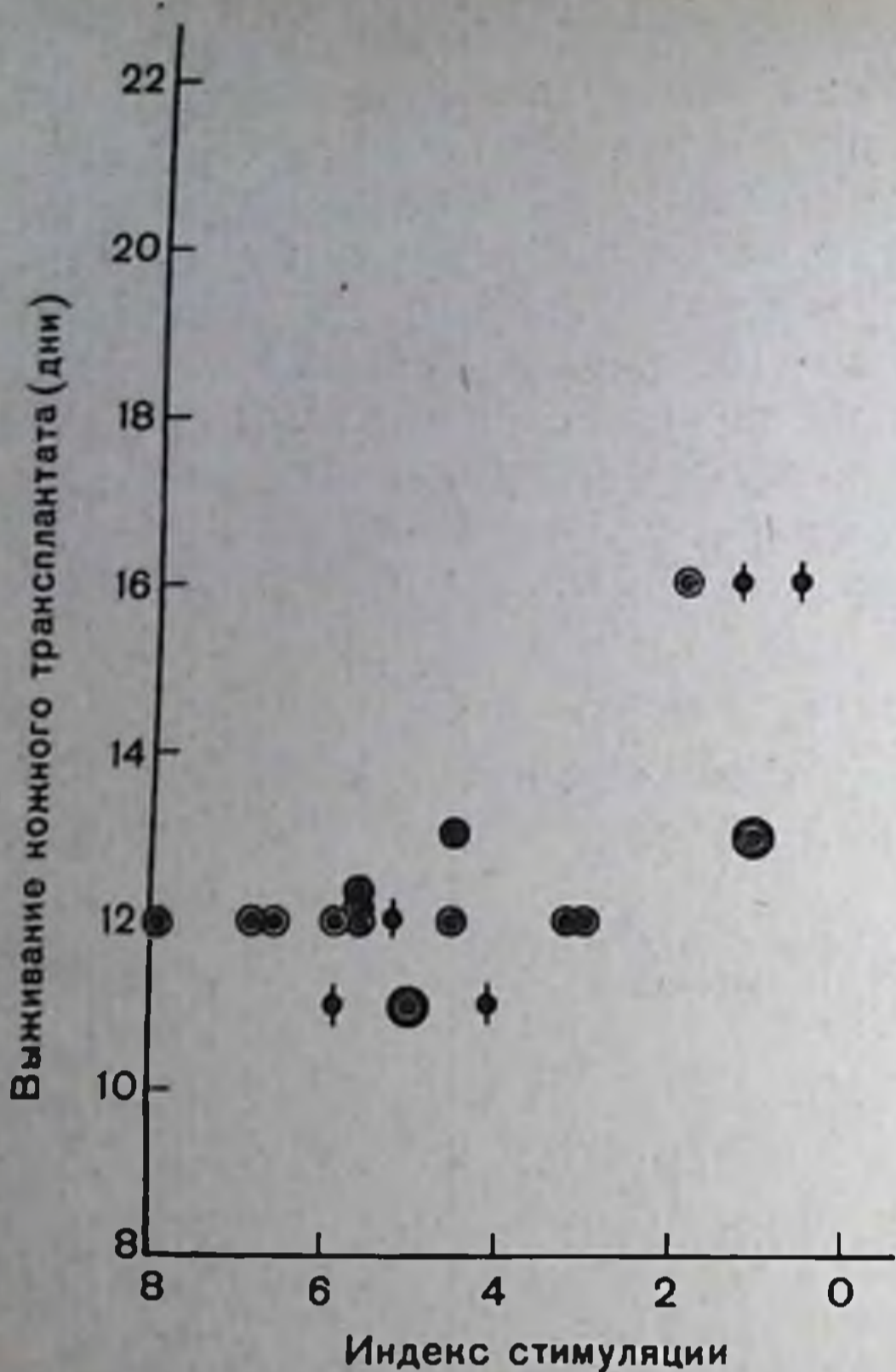


Рис. 33.7. Связь между стимуляцией в СКЛ и выживаемостью трансплантата кожи.

иммунизировать таких индивидов пересадкой кожи, то необходимо исключить возможность невыявленной гетерогенности по FOUR, LA или обоим локусам, иными словами, сыворотка, полученная после пересадки кожи, может быть направлена не против MLC, а против невыявленных антигенов FOUR или LA. Пока серологические тесты были отрицательны. Мы использовали также самый чувствительный из известных нам тестов элиминации антигенов *in vivo*, выживаемость тромбоцитов донора, меченных ^{51}Cr . Тромбоциты не несут продукта локуса MLC, но несут продукты локусов FOUR и LA, и мы знаем, что продолжительность жизни тромбоцитов всегда уменьшается после пересадки несовместимой кожи. Более чем в 90% наших тестов с донорами и реципиентами, неродственными, но идентичными по HL-A продолжительность жизни тромбоцитов после отторжения кожного трансплантата была нормальной, следовательно, антител против FOUR и LA не было. Однако в некоторых случаях сыворотки могли подавлять реак-

тивность в СКЛ между идентичными по HL-A неродственными индивидами и таким образом эти сыворотки возможно могли распознавать детерминанту MLC.

Simonsen. Присутствие на этой конференции доставляет мне истинное наслаждение, так же как знакомство с очень многими новыми наблюдениями. Однако вместе с тем это занятие несколько утомительное. К концу такой напряженной сессии, как наша, чувствуется потребность четко сформулировать основной смысл сказанного и отличить его от случайного «шумового фона». Мне кажется, что основной смысл лежит где-то близко к последнему замечанию Klein, т. е., по всей вероятности, перед нами огромный комплекс генов и соответствующих генных продуктов, выполняющих практически аналогичные физиологические функции. Эта функция, связанная с рецепторами, по крайней мере рецепторами Т-клеток. Некоторые из этих рецепторов или большинство их, а может быть и все они являются также трансплантационными антигенами, если правильно избрана тест-система, и именно в этой области и возникает шумовой фон. Например, мне кажется что, если кто-то говорит о том, что комбинация 2R с 4R дает реакцию в СКЛ, но не отторгает кожных трансплантатов, то это замечание весьма второстепенное.

Конечно, трансплантационные реакции зависят от многих факторов, например от относительной концентрации соответствующих антигенов на различных типах клеток. Некоторые антигены возможно сильнее проявляются

на коже, чем на других клетках, другие антигены, возможно, лучше всего проявляются на лимфоцитах или на эритроцитах. Кроме того, чувствительность наблюдаемой трансплантационной реакции может быть весьма различна в разных тест-системах. Например, если взять подавляющее большинство известных локусов гистосовместимости у мышей и у крыс, которые выявляются по отторжению кожных трансплантатов, то их продукты, видимо, совсем не являются антигенами, если рассматривать их при пересадке почек или при пересадке сердца, и не вызывают реакции в СКЛ при обычно применяемой методике. Таким образом, все это не представляет большого интереса, если мы не заинтересованы в пересадке именно того или другого органа или ткани. Мне кажется, что некоторые антигены являются трансплантационными антигенами в одной системе, но не в другой. Некоторые из них более сильные, другие более слабые. Однако я считаю вероятным, что все эти Ig-продукты (рецепторы Т-клеток) имеют какой-то генетический полиморфизм, который можно обнаружить при той или другой трансплантационной реакции, если правильно его искать. Значительно больший интерес представляет вопрос о том, являются ли антигенные детерминанты, ответственные за различные реакции трансплантационного иммунитета, сами частью распознающего участка. Но я не знаю сейчас, как можно ответить на этот вопрос.

Мы совершенно не касались одного момента, а именно существования всех слабых локусов гистосовместимости. Если некоторые из нас правы, утверждая, что в комплексе H-2 продукты генов являются и рецепторами и трансплантационными антигенами, если правильно их рассматривать, то, очевидно, когда-нибудь мы убедимся, что продукты слабых локусов также имеют рецепторную функцию. Интересно отметить в этой связи, что Festenstein и соавт. нашли локус MLC, не сцепленный с комплексом H-2. Кроме того, если трансплантационные антигены являются детерминантами, находящимися на рецепторных молекулах, то отсюда следует, что В-клетки также имеют рецепторы, но в этих клетках они значительно менее важны, чем иммуноглобулиновые рецепторы. Вот основные моменты, которые я запомнил из наших дискуссий на этой сессии.

Председатель McDevitt. Возможно, что мнение Simonsen о том, что все сложные генетические системы, входящие в главную систему гистосовместимости мыши и рассмотренные нами на этой сессии, по существу аналогичны и что выявляемые нами различия обусловлены использованием разных тест-систем, слишком упрощено. По-видимому, ясно, что все эти гены H-2K, Ig, MLC и H-2D, а также гены, не выявляющиеся серологически, но ответственные за отторжение трансплантата и, возможно, за РТПХ, связаны в двух важных отношениях. Во-первых, они, по-видимому, участвуют в феноменах распознавания какого-то типа, во-вторых, все они тесно сцеплены и возможно образовались в результате повторяющихся дупликаций внутри хромосом. Таким образом, есть основания полагать, что они имеют какую-то функциональную связь, а также общее структурное и генетическое происхождение. Однако вполне возможно, что в процессе эволюции эти тесно сцепленные гены благодаря селекции приобрели различные функции. Таким образом, следует учитывать, что возможно некоторые из этих генов, например, H-2K и H-2D и тесно связанные с ними серологически «немые» гены, ответственные за отторжение трансплантата, участвуют в распознавании клетки клеткой в процессе дифференцировки и органогенеза. Вместе с тем другие гены в этом комплексе, возможно, приобрели иные иммунологические функции. Так, возможно, что Ig-гены представляют собой набор генов, которые селективно проявляются только на некоторых классах иммуно-

компетентных лимфоцитов и возможно даже, что некоторые Ig-гены селективно проявляются на подгруппах данной популяции иммунокомпетентных клеток, т. е. продукты Ig-генов характеризуются клональным проявлением, что весьма отличается от большинства трансплантационных антигенов. Необходимо провести много экспериментальных исследований, прежде чем удастся выявить взаимоотношения между этими различными генами. Даже если принять гипотезу Klein, что все эти гены участвуют в каком-то типе распознавания, гипотезу Bodmer о том, что многие или все эти гены участвуют во взаимодействии клетки с клеткой в процессе дифференцировки, и мнение Simonsen, что все эти генные продукты являются по существу трансплантационными антигенами, дающими различные физиологические эффекты, все же еще остается место (как теоретически, так и реально в IX группе сцепления мыши) для предположения, что все эти функции существуют и что на них наслаивается ряд высоко специализированных функций, представленных, например, генами иммунного ответа, а возможно и другими контролирующими весьма специфические типы клеточного взаимодействия, которые пока еще не были установлены. К счастью, благодаря существованию большого количества точно охарактеризованных рекомбинантных хромосом H-2 на стандартном инбредном фоне, очевидно, можно будет быстро получить прямой экспериментальный ответ на многие вопросы, поднятые в нашей дискуссии.

Сессия 3

ГЕНЫ ИММУННОГО ОТВЕТА, СЦЕПЛЕННЫЕ С ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫМИ АЛЛОТИПАМИ, И ДРУГИЕ ТИПЫ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА

Генетический контроль моноклональной продукции антител. Связь между идиотипом и аллотипом. Связь идиотипа с Ig-аллотипом. Подавление идиотипа. Определение идиотипа В-клетками (независимость от носителя). Селективное выведение животных с высоким и низким образованием антител — Ig-гены, не сцепленные ни с H-2, ни с Ig-аллотипом. Линейная вариабельность специфических спонтанных антигаптенных антител.

Определение терминов или сессии 3

На этой сессии подробно рассматривается связь между образованием гомогенных или идиотипических антител и аллотипами иммуноглобулинов. Поскольку разные докладчики, в частности Krause и Serpellini, пользуются несколько различными обозначениями кроличьих иммуноглобулиновых аллотипов и поскольку многие иммунологи не знакомы с системой обозначения мышинных иммуноглобулиновых аллотипов, редакторы решили, что чтение протокола этой сессии будет более легким, если дать здесь краткую номенклатуру аллотипов.

Маркеры кроличьих иммуноглобулиновых аллотипов (за немногим исключением) представляют собой серологическое проявление аллельных различий последовательности аминокислот в нескольких различных участках тяжелых цепей иммуноглобулинов или аллельных различий последовательности аминокислот в «неопределенных» позициях в легких цепях каппа (K) и лямбда (λ). Определенный локус для аллотипа обозначается курсивной строчной буквой (например, *a*, *b*, *c*), а разные аллели на этом локусе представлены рядом пронумерованных специфичностей (например, 1, 2, 3). Основные аллотипические маркеры у кролика таковы:

а) 1, 2, 3 — набор трех аллелей, представляющих аллотипические различия последовательности аминокислот в вариабельной области тяжелых цепей IgG, IgA и IgM;

б) 4, 5, 6, 9 — ряд аллотипических маркеров на легких цепях каппа;

в) 7, 8 — маркеры аллельных аллотипов на легких цепях лямбда.

Кроме того, существует ряд других различий по аллельным аллотипам (*a*11, 12 и *a*15, 16), которые локализуются в константной области тяжелых цепей IgG. В тексте они конкретно не упоминаются, хотя ряд ораторов, выступавших на 2-й и 3-й сессиях, упоминают их косвенно, рассматривая аллотипические гены константной области (C) у кроликов.

Основным источником неясностей является тот факт, что Krause пользуется более новыми условными обозначениями аллотипов, *a*1, *b*4 и т. д., а Serpellini пользуется старыми обозначениями, согласно которым перед

всеми названиями иммуноглобулиновых аллотипов надо ставить прописную букву А, например: Аa1, Аb9 или Аb5. Читатель должен помнить, что b5 или b9 означает то же самое, что Аb5 или Аb9.

Еще большую путаницу внесли в дискуссию те докладчики, которые говорят о мышинных иммуноглобулиновых аллотипах. Это объясняется тем, что некоторые из них называют тип иммуноглобулина «аллотипом линии С57BL» или «аллотипом BALB/с», другие же пользуются более общепринятыми и технически правильными обозначениями. Наконец, третьи в своих выступлениях и таблицах применяют оба метода обозначения иммуноглобулинового аллотипа линий. К счастью для читателя, все гены иммуноглобулиновых аллотипов мышей входят в одну группу сцепления, включающую четыре разных локуса аллотипов, представляющие аллельные различия последовательности аминокислот в константной области тяжелых цепей γG_1 , γG_{2a} , γG_{2b} и γA . Среди инбредных линий мышей все линии, имеющие определенную аллотипическую специфичность тяжелых цепей γG_{2a} , обладают одним и тем же набором аллотипических специфичностей остальных трех тяжелых цепей этой группы сцепления. Таким образом, для инбредных линий мышей можно пользоваться обозначением одной буквой (например: a, b, c, d, e) для данной серии аллелей аллотипических специфичностей всех четырех тяжелых цепей, имеющихся у данной инбредной линии. Этот набор маркеров аллотипов у мыши обозначается буквами Ig, следовательно, линию можно обозначать Ig^a или Ig^b и т. д. Можно также обозначать аллотип C_H данной линии буквами a или b или c. Возможен также третий вариант, а именно: можно указать, что линия несет группу сцепления, кодирующую аллотипы, идентичную С57BL или BALB/с или какой-то другой линии, принятой за прототип. Все три метода используются разными ораторами и в разных таблицах. Кроме того, в табл. 63 Biozzi пользуется системой обозначений, разработанной Lieberman и Potter, где локусы аллотипов Ig обозначены как сцепленный набор локусов — G, H, A и F. Biozzi указывает также класс тяжелых цепей, на которых проявляются эти локусы и цифровые обозначения аллотипических специфичностей, применяемые Lieberman и Potter. Таким образом, эта система не должна вызвать особой путаницы.

Председатель Warner. Мне кажется после сессии 2 можно сделать заключение, что у ряда видов животных можно обнаружить гены иммунного ответа, сцепленные с главными системами гистосовместимости и проявляющиеся в Т-клетках. Вопрос о том, проявляются ли эти же самые гены также в В-клетках, пока еще остается спорным.

На этой сессии мы будем говорить о том, существуют ли и другие типы генов иммунного ответа, не сцепленные с комплексом H-2, но возможно сцепленные с иммуноглобулиновыми аллотипами, со слабыми локусами гистосовместимости, или вообще не связанные с каким-либо известным сейчас генетическим маркером.

Второй вопрос, которым мы сейчас займемся, заключается в том, проявляются ли эти другие гены в Т-клетках, В-клетках, макрофагах или каких-то других типах клеток, еще не выясненных нами, но, возможно, участвующих в иммунном ответе. Таким образом, на этой сессии будут рассматриваться три общие темы. Во-первых, мы будем обсуждать гены специфического иммунного ответа, сцепленные с иммуноглобулиновыми аллотипами, во-вторых, те сцепленные с аллотипом факторы иммунного ответа, которые связаны с ответом более чем на одну антигенную детерминанту. Третья тема заключается в том, существуют ли другие механизмы генетического контроля иммунного ответа, не сцепленные ни с H-2, ни с аллотипом.

Краусе выступит со вступительным словом, где будет дана оценка со-временному состоянию исследований в этой области и основных проблем с его точки зрения.

Краусе. Я буду говорить о связи между генетическим контролем иммунного ответа и структурными генами, кодирующими молекулы антител. В частности, я остановлюсь на следующих вопросах: существует ли связь между специфическим иммунным ответом и структурными генами, кодирующими специфические антитела; является ли специфический аллотип или специфическая комбинация аллотипов более характерной для определенных специфически активных центров, чем для других. Таким образом, с позиции серологии мы попытаемся определить, имеется ли связь между аллотипом и идиотипом. Другие проблемы могут иметь более дальний прицел, они касаются связи между другими структурными генами молекулы IgG (т. е. структурными генами константной области) и иммунным ответом. Например, могут ли более широкие поиски у человека иммунного ответа на большое количество углеводов бактериального происхождения выявить преимущественную селекцию подгруппы IgG₂, как это впервые предположили Yount, Kunkel и Kabat.

Я собираюсь сконцентрировать свое внимание на трех аспектах: связь между генетическим контролем иммунного ответа и аллотипом; наследование идиотипа и связь между идиотипом и аллотипом. Я уверен, что другие расширят эти замечания со своей собственной точки зрения.

Наконец, надо сделать несколько кратких замечаний о влиянии генетических факторов на иммунный ответ на стрептококковый углевод, поскольку на этой конференции пока не был подробно обсужден генетический контроль иммунного ответа на бактериальные антигены. Более того, методика иммунизации, применяемая сейчас в ряде лабораторий для получения антител против бактериальных углеводов, весьма отличается от методики иммунизации синтетическими антигенами. Я думаю, что следует помнить об этих различиях.

Цельные убитые нагреванием стрептококки вводятся внутривенно. Они «покрыты» на поверхности более или менее одинаковым антигеном. Обработка пепсином удаляет все поверхностные антигены, кроме группоспецифического углевода. Интересно, что хотя внутривенно вводится цельная бактерия, 90% антител направлено против углевода. Действительно, почти весь IgG, вырабатываемый кроликом, представляет собой антитела против углевода. Схема иммунизации предполагает внутривенное введение вакцины три раза в неделю в течение четырех недель. Затем дается отдых на 3—4 мес перед второй серией инъекций. Если периода отдыха нет, то вторичный ответ отсутствует. В общем количество антител после третьего или четвертого курса инъекций не больше, чем после второго курса. Эти стрептококковые углеводы группы А и С представляют собой относительно простые, разветвленные полимеры рамнозы, несущие терминальные аминокислоты. В полисахариде группы А терминальный сахар является β-N-ацетилглюкозаминном, а в полисахариде группы С терминальный аминокислотный сахар представляет собой α-N-ацетилгалактозамин. Антигенная специфичность углеводов группы А и С объясняется этими двумя разными терминальными аминокислотами.

Результаты, полученные при изучении ответа антител у большого количества кроликов, иммунизированных стрептококковыми вакцинами, позволяют предполагать, что существуют генетические воздействия, влияющие на иммунный ответ к этим поверхностным углеводам. В табл. 49 указан иммунный ответ на углевод группы С у 31 произвольно отобранных кроли-

ТАБЛИЦА 49

Иммунный ответ к углеводу группы С

Кролики	Количество животных	Концентрация антител, мг/мл		
		средняя	диапазон	медiana
«Случайные»	31	14	1—36	12
F ₂ — сильно отвечающие	52	21	5—58	18
F ₂ — слабо отвечающие	14	7	1—14	7

«Случайные» по сравнению с сильно отвечающими $t = 2,649$; $p < 0,01$.

«Случайные» по сравнению со слабо отвечающими $t = 4,191$; $p < 0,001$.

Сильно отвечающие по сравнению со слабо отвечающими $t = 6,233$; $p < 0,001$.

ков после второй иммунизации. Средняя концентрация антител составляет 14 мг/мл в пределах от 1 до 36 мг, медиана концентрации равна 12. Среди той популяции кроликов были отобраны сильно отвечающие и слабо отвечающие животные, чтобы получить поколение F₁. Из этого поколения F₁ были отобраны животные с самой слабой реакцией из слабо отвечающих и с самой сильной реакцией из сильно отвечающих, чтобы получить сильно отвечающих гибридов F₂ и слабо отвечающих гибридов F₂, как указано в табл. 49. У сильно отвечающих среднее количество антител составляет 21 мг/мл в пределах от 5 до 58, а медиана была равна 18. У 14 слабо отвечающих животных среднее количество антител составляло 7 мг/мл, а медиана равна 7. Критерий Стьюдента (t) выявил статистически достоверную разницу. Сильно отвечающие животные скрещивались между собой, чтобы получить поколение F₃, однако поддержание слабо отвечающего стока пришлось прекратить. К тому же эти животные не представляли большой ценности для того, чтобы обеспечить большое количество антител с молекулярным единообразием. Я хочу подчеркнуть, что как у слабо, так и у сильно отвечающих животных почти весь сывороточный IgG представлял собой антитела к углеводу. Таким образом, складывается впечатление, что между двумя группами существовали большие различия по пролиферации лимфоидной ткани вообще, а не плазмоцитов. Возможно, что эта тема окажется благотворной при дальнейшем изучении. Eichman продолжил это исследование на ряде инбредных линий мышей. Он также применял внутривенную иммунизацию стрептококками. Позднее на этой сессии Rajewsky расскажет о его результатах. У мышей можно наблюдать столь же сильный синтез антител, как у кроликов, но не в каждой инбредной линии. Видимо, как у кроликов, так и у мышей на иммунный ответ к бактериальным углеводам влияют генетические факторы. Мимоходом я бы отметил, что некоторые из наших сильно отвечающих животных были отправлены Pincus в Национальный институт здравоохранения и оказалось, что они очень сильно отвечают также на пневмококковый полисахарид, который им вводили в виде цельной пневмококковой вакцины.

Особая сторона иммунного ответа у кроликов, как и у мышей, касается влияния генетических факторов на гетерогенность иммунного ответа. На рис. 34 показаны микрозональные электрофореграммы иммунных сывороток у 12 случайно отобранных кроликов. Почти весь их гамма-глобулин

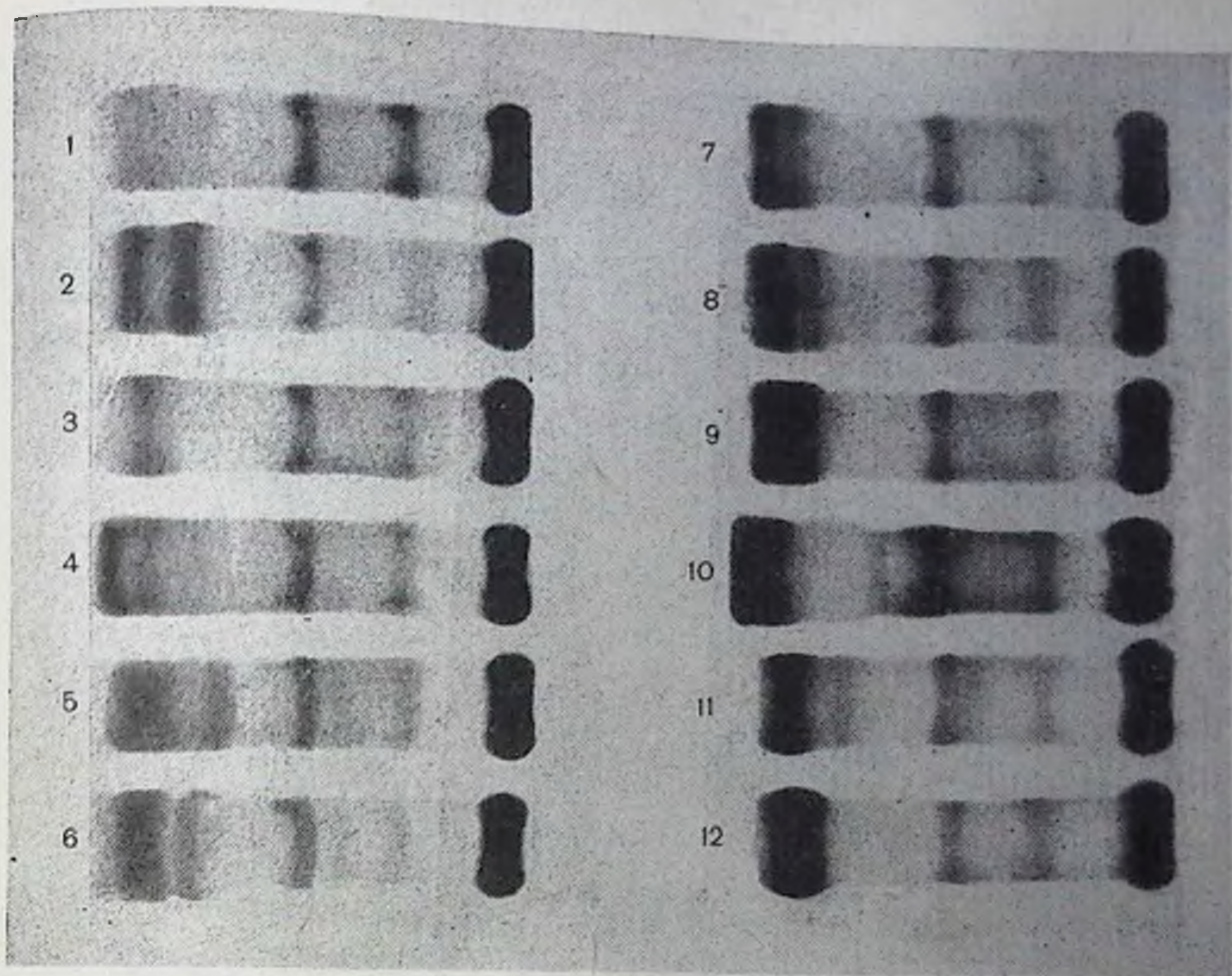


Рис. 34. Микрозоны электрофоретических образцов антисывороток 12 беспородных кроликов, иммунизированных стрептококком группы С. Антисыворотка была собрана после второй серии внутривенной иммунизации.

(показан слева) представляет собой антитела IgG к стрептококковому углеводу. У некоторых животных, например № 12, наблюдается резко выраженная гомогенность синтеза антител, но у других животных, например № 9, наблюдается сильный ответ при значительной клональной гетерогенности. Наконец, у третьих животных, например у кролика № 1, синтеза антител почти нет и при электрофорезе нет указаний на ограничение гетерогенности.

Несколько лет назад были начаты исследования, чтобы установить, наследуется ли ограниченная гетерогенность. Этот вопрос решить трудно отчасти потому, что ограниченная гетерогенность — это черта не ясная и ее трудно точно определить. Не существует вполне удовлетворительной системы для тестирования этой характеристики. Тем не менее мы постарались по возможности точнее оценить приведенные электрофореграммы. Антисыворотки разделялись на гетерогенные, например № 1 и № 9; с ограниченной гетерогенностью, например № 7 и № 4; моноклональные, например № 12. На рис. 35 показаны микрозональные электрофореграммы антисывороток от нескольких пар производителей в инбредной колонии. Родители с гетерогенным слабым ответом давали потомство, которое также отличалось слабым ответом без признаков ограниченной гетерогенности. Родители с высоким гетерогенным ответом давали потомство с подобным ответом. Действительно, эти ответы весьма гетерогенны. Например, электрофорез легких цепей в полиакриламиде выявляет множественные полосы. Напротив,

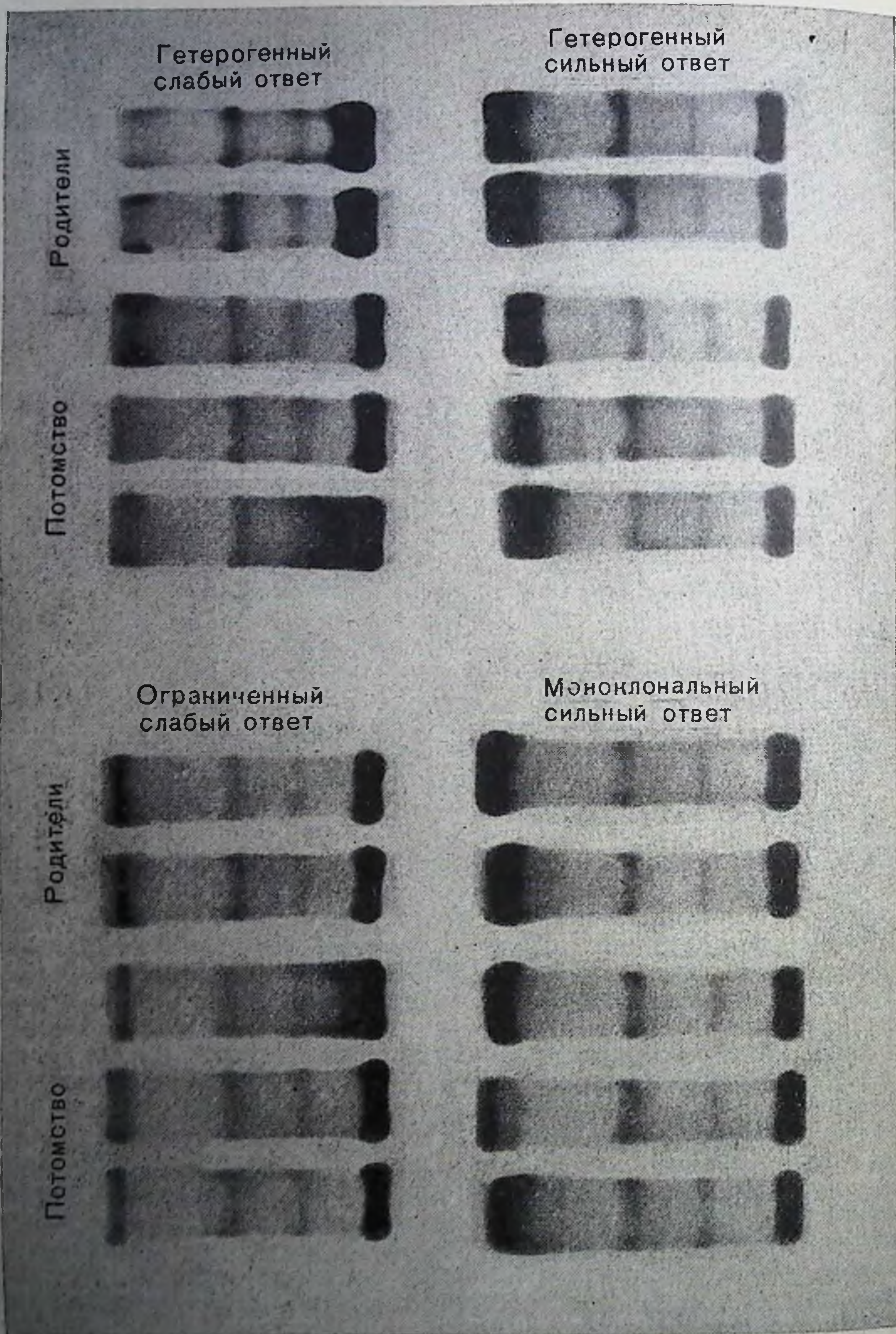


Рис. 35. Исследования с помощью скрещивания, демонстрирующие влияние генетических факторов на гетерогенность иммунного ответа. Микрозоны электрофоретических образцов антисывороток родителей и потомства после иммунизации стрептококками группы С. Гамма-глобулины — слева. Большая часть IgG — антитела к групповому углеводу С.

животные с ограниченным слабым ответом и с моноклональным сильным ответом имеют потомство, ответ которого подобен ответу родителей.

Аналогичные исследования проводят Pincus и Mage в Национальном институте здравоохранения с кроликами, иммунизированными пневмококковой вакциной. Eichmann, а также Brites в нашей лаборатории обнаружили большое различие между инбредными линиями мышей по степени гетерогенности антител к стрептококковому углеводу. Некоторые инбредные линии дают гетерогенный ответ, а другие не дают. Можно только гадать о причинах синтеза антител ограниченной гетерогенности. Одно из возможных объяснений заключается в том, что он детерминируется рядом структурных генов активных центров, которые могут проявиться при стимуляции антигеном. В этом случае ограниченное количество различных молекул антител, найденное в этих опытах, может объясняться рядом механизмов. Можно допустить, что животные с ответом моноклонального типа обладают ограниченной частью того набора генов, который имеется у животных с гетерогенным ответом. С другой стороны, количество генов может быть столь же большим, но наследственные контрольные механизмы подавляют фенотипическое проявление некоторой части генетической информации. В связи с последним механизмом можно предположить, что проявление не подавленной фракции набора генов усиливается.

Из этих кратких замечаний о генетических аспектах иммунного ответа на бактериальные углеводы у кроликов и мышей можно сделать вывод, что указанная система окажется ценной для изучения связи между генетическим контролем иммунного ответа и генами, кодирующими структуру IgG.

Так, мы подошли к вопросу о связи между генами иммуноглобулинового аллотипа и иммунным ответом. Можно допустить, что при любом данном иммунном ответе существует связь между иммунным ответом и генами иммуноглобулинового аллотипа, так как прямо или косвенно специфические антитела являются конечным продуктом обеих категорий генов. Последующие докладчики также будут затрагивать указанный вопрос, поэтому я расскажу здесь лишь о наблюдениях, сделанных в нашей лаборатории.

Kindt начал систематические поиски аллотипического предпочтения антител против стрептококковых углеводов в нашей колонии кроликов. В одном опыте сильно реагировавшая самка продуцировала 17 мг/мл антител с аллотипом a2, b4; самец с аллотипом a3, b9 реагировал слабо и продуцировал только 3 мг/мл антител. Всего было получено 10 крольчат F₁ в двух пометах. Все они имели аллотипы a2, a3, b4, b9. Препараты IgG из сыворотки родителей и потомства до иммунизации исследовались на присутствие и распределение аллотипических маркеров. Точно так же иммунный IgG был исследован на присутствие и распределение аллотипиче-

ТАБЛИЦА 50

Концентрация аллотипов H- и L-цепей в преиммунном и иммунном IgG у гетерозиготного потомства F₁

	Аллотип: мг/мл сыворотки			
	a2	a3	b4	b9
Предиммунный	1,1	2,2	2,8	0,6
Иммунный	10,1	14,5	25,7	1,1
Увеличение:	9,0	12,3	22,9	0,5
общее	21,3	23,4		
%	38	52	97	2

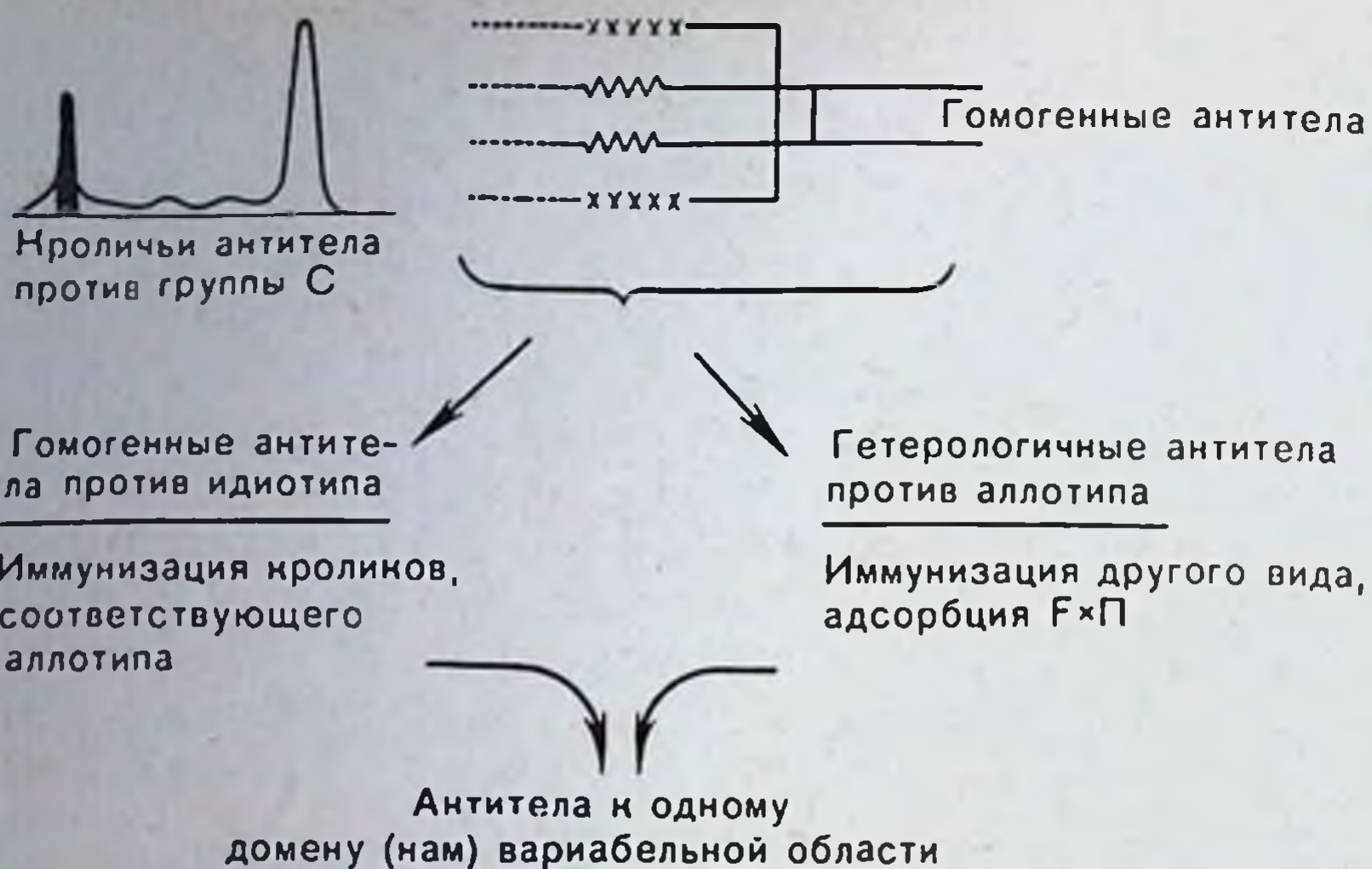


Рис. 36. Диаграмма, демонстрирующая метод для получения гомологичной и гетерологичной антиидиотипической сыворотки к групповым С антителам с молекулярным единообразием.

ских маркеров. Результаты, приведенные в табл. 50, показывают среднее процентное распределение аллотипических маркеров IgG до иммунизации и после иммунизации у 10 сибсов. Приведенные цифры — это количество антител в мг/мл сыворотки.

Относительное количество IgG с маркером a2 или a3 сильно не изменилось, но в иммунных сыворотках отмечен выраженный сдвиг с преимущественной селекцией маркера b4. Концентрация b4 повысилась от 2,8 в препаратах, взятых до иммунизации, до 25,7 в иммунных сыворотках, тогда как концентрация маркера b9 увеличилась только от 0,6 до 1. Это указывает на то, что маркер b4 имеет селекционное преимущество по сравнению с b9. Возможно, что ответ на данный антиген не достигает высокого уровня при аллотипе b9, этот ответ мог бы быть получен только, если бы кролики иммунизировались другим антигеном. Это наблюдение означало бы предпочтительную ассоциацию между специфичностью антител и определенными аллотипическими аллелями.

Почему при этом специфическом иммунном ответе b4 селекционируется избирательно по сравнению с b9? Можно только рассуждать об этом теоретически. Можно допустить, что некоторые структурные гены более «совместимы», чем другие, с генами, контролирующими синтез антител. Возможно также, что антитела одного аллотипа обладают большим аффинитетом для данного антигена, чем антитела иного аллотипа. Этот вопрос, очевидно, будет решен дальнейшим количественным исследованием генетических маркеров антител к антигенным детерминантам, продуцируемым у гетерозиготных животных.

Теперь мы подходим к соотношению между генами иммунного ответа и генами, кодирующими идиотипические детерминанты. Прделано слишком много исследований, которые поддерживают мнение, что идиотипические детерминанты включают особую последовательность аминокислот, имеющую отношение к активным центрам, чтобы перечислять их. Для целей обсуждения представим себе два разных типа идиотипии. Это по существу рабочее определение идиотипии, проиллюстрированное в виде схемы на рис. 36. Номенклатура, обсуждавшаяся на I Международном конгрессе иммуноло-

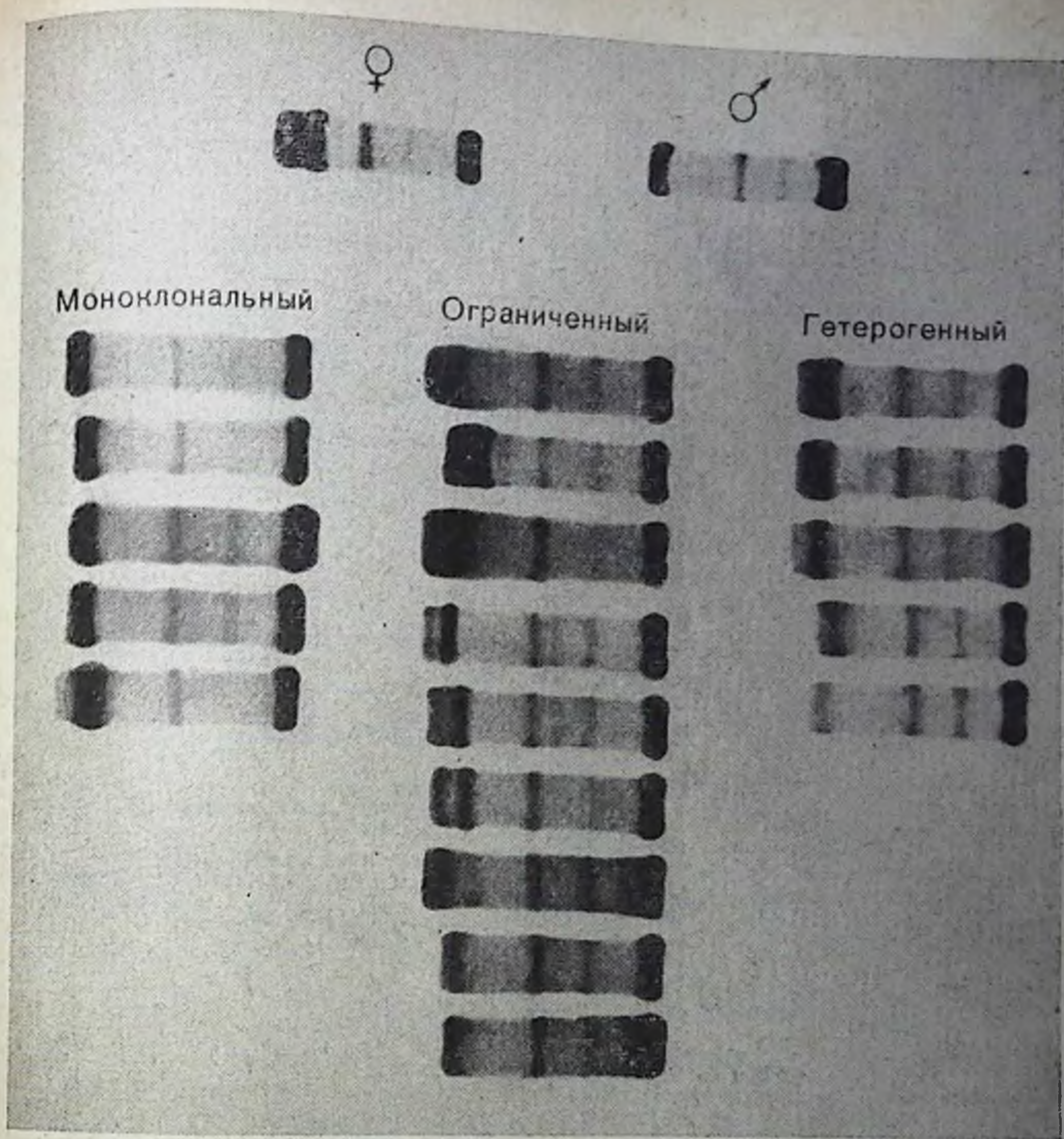


Рис. 37. Микрозоны электрофоретических образцов антисыворотки от потомства родителей с антителами ограниченной электрофоретической гетерогенности. Антитела получены иммунизацией стрептококками группы С.

гов, была предложена Kupke. Я вкратце рассмотрю ее в рамках нашей собственной системы. Гетерологическая идиотипия выявляется антителами против данных антител, полученными у другого вида. Гомологическая идиотипия выявляется антителами, полученными у аллотипически подобранного животного того же вида. Изологическая идиотипия выявляется антителами, полученными у инбредных животных.

Kupke вначале называл гетерологичную идиотипию миеломных белков индивидуальной антигенной специфичностью. В нашей лаборатории антитела против идиотипа получают при иммунизации антителами, обладающими едиными свойствами, как показано на рис. 36. Мы стремимся, насколько это возможно, пользоваться только теми антителами для идиотипических исследований, которые были тщательно выделены. Такой препарат антител состоит преимущественно из одного класса молекул и ясно, что идиотипические антисыворотки, направленные против него, будут иметь

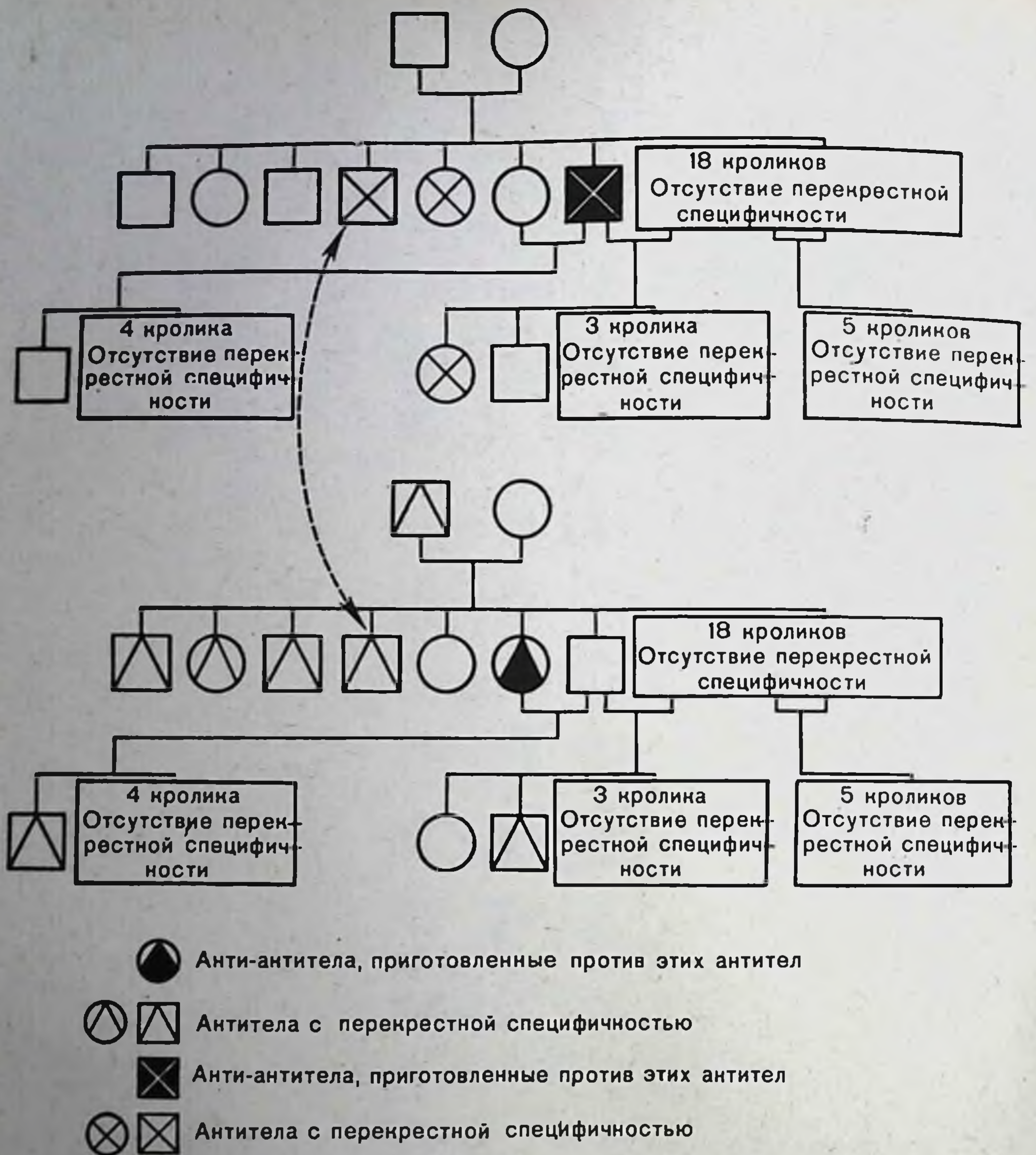


Рис. 38. Дубликат родословной одной семьи инбредных кроликов, все члены которой были иммунизированы стрептококком группы С. Антиидиотипическая сыворотка приготовлена против изолированных комплексов кроличьих антител, обозначенных закрашенными символами.

специфичность для преобладающей идиотипической детерминанты или детерминант. Мы занимались преимущественно приготовлением гетерологичных идиотипических антисывороток путем иммунизации морских свинок изолированными антителами моноклонального типа. Ранее морских свинок делали толерантными к кроличьему IgG путем внутривенной инъекции 5 мг IgG.

На рис. 37 показана для примера семья с большим количеством ограничено отвечающих животных, родившихся у родителей с весьма ограниченным ответом. Изучение подобных родословных навело Eichmann и Kindt на мысль о генетических факторах, которые могут ограничивать гетерогенность антител. Такая большая частота моноклональных ответов в ин-

бредной семье, возможно, объясняется лимитированной вариабельностью идиотипа. Отсюда можно предположить, что гетерогенность антител детерминируется относительно небольшим количеством разных генов, активированных при антигенной стимуляции. На основании подобных соображений эти исследователи приступили к поискам наследования идиотипических маркеров в инбредной семье такого же рода, как показано здесь. На рис. 38 показана родословная семьи, включая поколение F_2 . Каждый член этой семьи иммунизировался одной и той же стрептококковой вакциной. Антитела с молекулярным единообразием, выделенные от двух кроликов, которые обозначены здесь черными знаками, были названы антителами пробандов. Они использовались как иммуногены для приготовления антисывороток против идиотипа. Нормальные и иммунные сыворотки всех кроликов в этих семьях были исследованы двумя антисыворотками против идиотипа в поисках антител с этими идиотипическими детерминантами. Ни одна из нормальных сывороток не реагировала с этими антиидиотипическими сыворотками, так же как и сыворотки 48 посторонних кроликов.

В верхней части рисунка члены семьи, которые реагировали с помеченной x идиотипической антисывороткой, обозначены светлыми квадратами и кружками со знаком x . В нижней части рисунка члены семьи, которые реагировали с антисывороткой против другого идиотипа, обозначены треугольниками на белом фоне. Антистрептококковая сыворотка от одного кролика, обозначенная пунктирной линией, идущей от верхней части к нижней части рисунка, обладала реактивностью с обеими идиотипическими антисыворотками. Этот кролик вырабатывал один вид антител, имевший одну идиотипическую детерминанту, и другой вид антител с другой идиотипической детерминантой.

Необходимо подчеркнуть, что у одного кролика были два вида антител с разными идиотипами. Если бы для приготовления антиидиотипической сыворотки были использованы все антитела изучаемой антисыворотки, то количество перекрестных реакций в данной семье равнялось бы 10 вместо 7 для идиотипа, помеченного x , и 4 для идиотипа, помеченного треугольником. Очевидно, антиидиотипическая сыворотка, приготовленная с помощью антител от этого кролика, выявила бы по крайней мере два разных идиотипа, а не только один идиотип. Необходимо помнить об этой возможности при обсуждении экспериментальных данных об идиотипических перекрестных реакциях. Конечно, для тщательного анализа генетики идиотипических детерминант требуется пользоваться моноспецифическими антисыворотками, если удастся их получить.

На основании этих исследований был сделан вывод, что повторяющиеся скрещивания брата с сестрой дали популяцию кроликов с ограниченным количеством идиотипов ответа на стрептококковый углевод группы С. В кроличьей семье с ограниченной вариабельностью идиотипа антигенная стимуляция часто селекционирует антитела с аналогичным или тождественным идиотипом и идиотипия, видимо, сохраняется на протяжении трех поколений. Это можно было бы объяснить, допустив, что соответствующие гены присутствуют в виде множественных псевдоаллелей и инбридинг ведет к идиотипической селекции посредством возникновения гомозиготности.

Отсутствие высоко инбредных кроликов препятствует тщательным генетическим исследованиям этого антигенного маркера вариабельной области. Для таких генетических анализов естественно более пригодны исследования на инбредных мышах. Они проводились в ряде лабораторий, включая нашу. Я не буду останавливаться на этих исследованиях, так как они будут представлены для дискуссии позднее. Достаточно сказать, что антитела

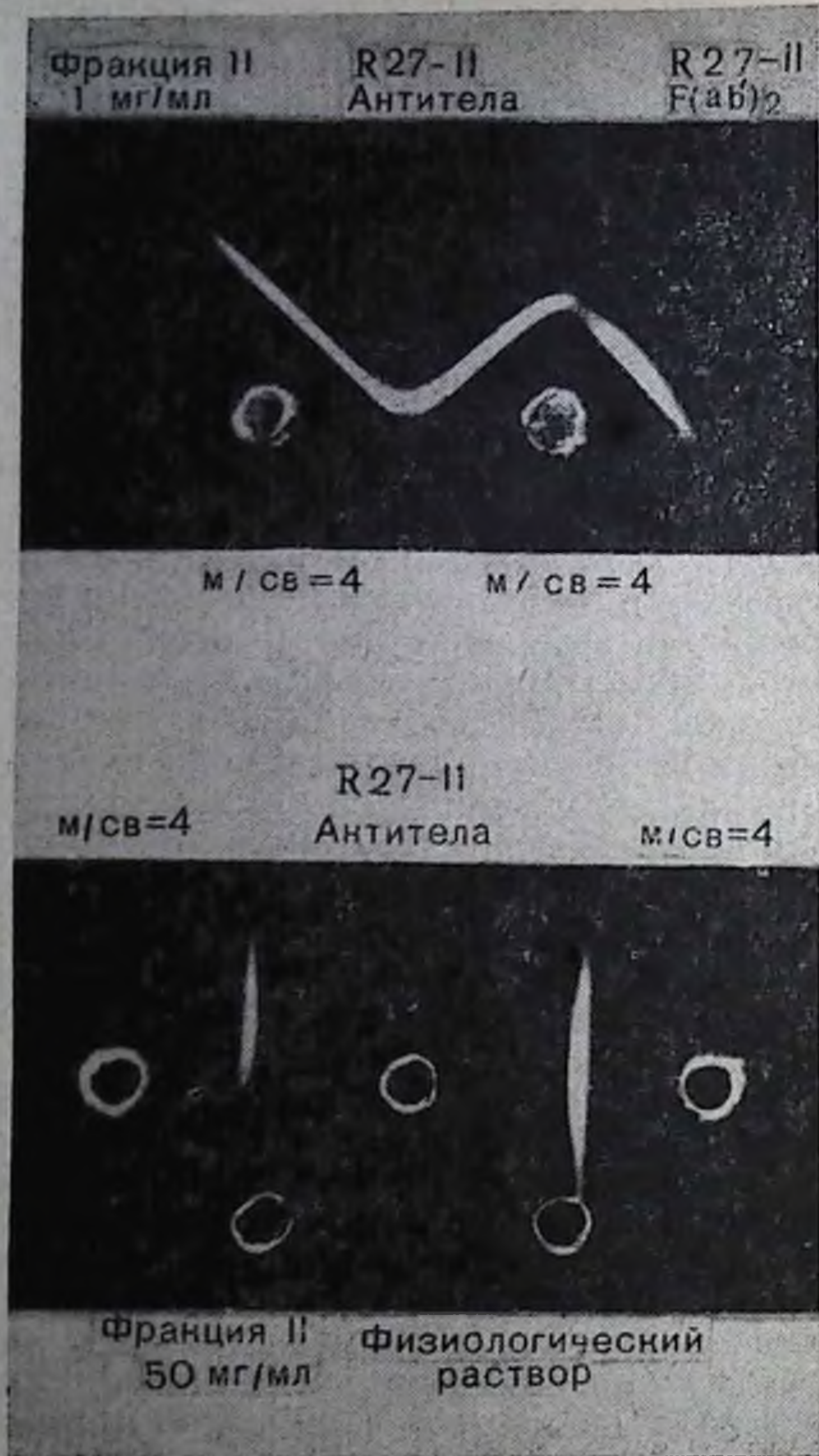


Рис. 39. Анализ сывороток против идиотипа с помощью двойной диффузии. Вверху: анализ с помощью двойной диффузии демонстрирует идиотипическую реакцию изолированных компонентов антител R 27-11. М/св-4 указывает, что антиидиотипическая сыворотка получена на морских свинках. Внизу ингибция реакции precipitation между антителами R 27-11 и антиидиотипической сывороткой, II фракцией гамма-глобулина в концентрации 50 мг/мл.

одного идиотипа встречаются у мышей одной линии и антитела этого идиотипа отсутствуют у другой линии. Ясно, что перед нами открывается путь к тщательному генетическому исследованию идиотипии.

Затем надо остановиться на соотношениях между идиотипом и иммуноглобулиновыми аллотипами. Kindt и Eichmann уже писали об этом вопросе и данные их нуждаются лишь в кратком комментарии. В принципе эти исследования основаны на использовании нормального IgG для подавления реакции precipitation против гетерологических идиотипов. Примером может быть анализ путем двойной диффузии, показанный на рис. 39. На верхней части рисунка мы видим, что антистрептококковые антитела дают специфическую идиотипическую реакцию. На нижней части рисунка показано подавление неиммунным смешанным IgG (фракция II) линии precipitation. Этот феномен Kunkel наблюдал при гетерологичной идиотипической реакции с миеломными белками. Вместо того чтобы пользоваться смешанным неиммунным IgG, в качестве ингибитора Eichman и Kindt применяли нормальный IgG от отдельных кроликов различными известными комбинация-

ТАБЛИЦА 51

Подавление идиотипической реакции преципитации различными нормальными IgG; значение I_{50} (относительная концентрация, требуемая для 50% подавления)

Ингибитор	Аллотип	I_{50}	Избыток сверхантител предиммунного пробанда
Антитела пробанда	a2, b4	1	—
Предиммунный IgG	a2,3, b4	64	1
» IgG			
Близнец 1	a2,3, b4	64	1
» 2	a2, b4	70	1
» 4	a2, b4	122	2
Случайный R 11	a2, b4	113	2
» R 12	a3, b4	250	4
» R 13	a2, b9	280	4
» R 15	a1, b5	800	12

ми аллотипов. Как видно из табл. 51, нормальный IgG того же аллотипа, что и идиотипические антитела были наиболее эффективным ингибитором антиидиотипических реакций преципитации. Показаны также величины (50% ингибция) различных нормальных IgG, применявшихся как ингибиторы антиидиотипической реакции преципитации. Количественные тесты подавления радиопреципитации ставились с 5 мкг меченых радиоактивной меткой антител пробанда и 25 мкг абсорбированной антиидиотипической сыворотки. Тесты проводились в широком диапазоне концентрации ингибитора, чтобы определить количество, необходимое для 50% ингибции. Количество антител пробанда, используемых в качестве ингибитора при тесте, принималось за единицу. Для 50% ингибции требовалось в 64 раза больше нормального IgG кролика-пробанда, чем антител от пробанда. В последнем столбе показан избыток ингибитора, необходимый, чтобы получить величину I_{50} , такую же, как дает нормальный IgG пробанда. Величины указаны для нескольких различных препаратов нормального IgG. Нормальный IgG от двух сибсов пробанда, имевших те же аллотипы, что и пробанд, оказался таким же эффективным ингибитором, как собственный нормальный IgG пробанда. Интересно отметить, что эффективным ингибитором оказался нормальный IgG от беспородного кролика R № 11, имевшего те же аллотипы a2/b4, что и пробанд. С другой стороны нормальный IgG от беспородных кроликов, имевших совершенно иные комбинации аллотипов, значительно менее эффективно подавлял идиотипические реакции, поэтому можно предположить, что идиотипическая специфичность антител пробанда ассоциируется избирательно комбинацией аллотипов a2, b4.

Эти опыты с ингибцией указывают на некоторое участие аллотипических детерминант в детерминировании идиотипа, но, возможно, они отражают также сцепление между генами, ответственными за идиотип, и генами, кодирующими а- и в-аллотипы. Надеюсь, что из этих вступительных замечаний будет ясно, что между иммунным ответом на аллотип и идиотип существуют интересные соотношения и теперь перед нами открыт путь для генетического исследования.

Председатель Warner. В этих опытах на кроликах Krause наметил почти все основные темы, которые будут обсуждаться на этой сессии, а именно: что существует генетический контроль образуемого количества антител, как при ограниченном, так и при гетерогенном типе иммунного ответа; что в

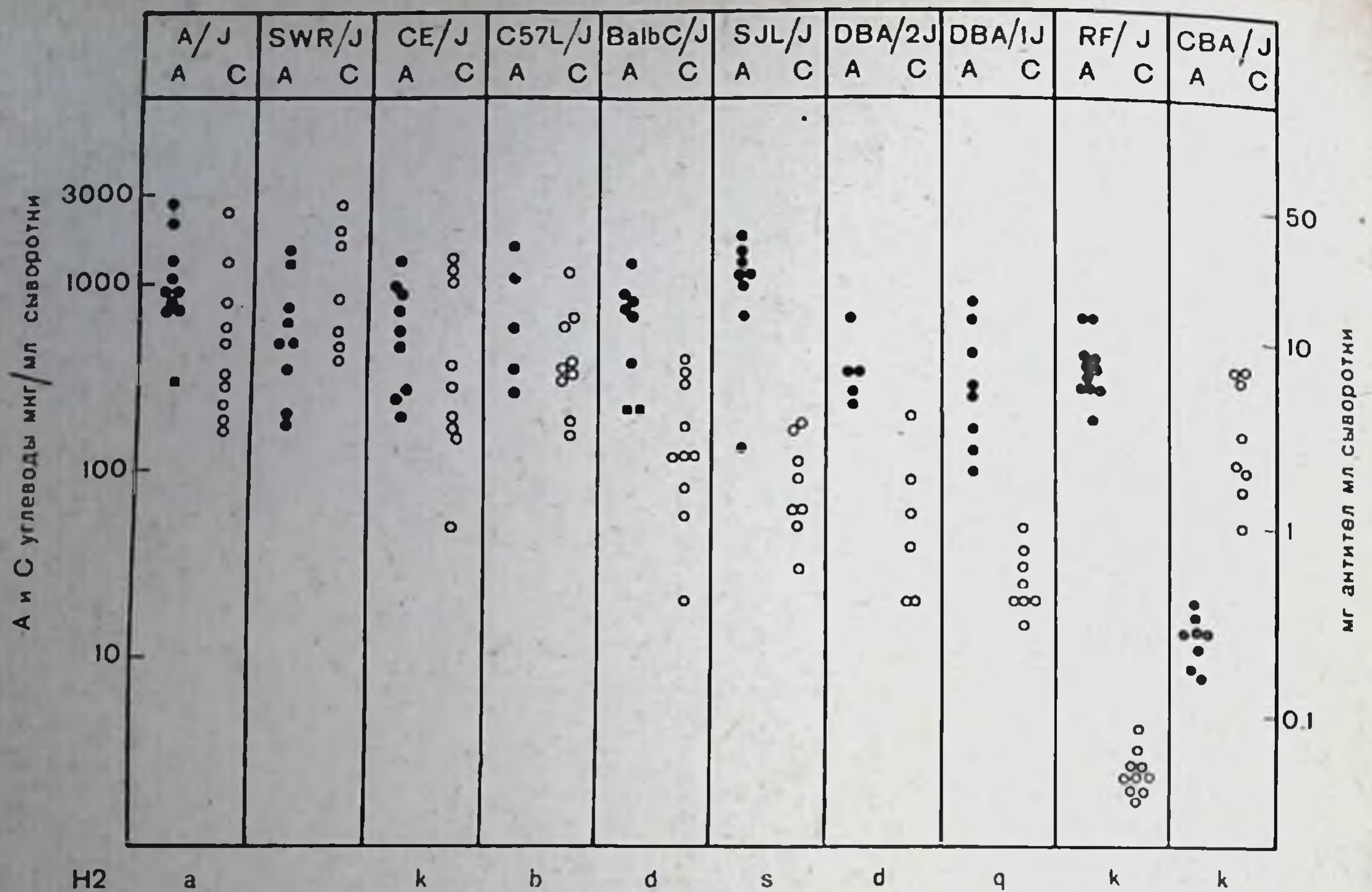


Рис. 40. Иммунный ответ различных инбредных линий мышей к углеводам стрептококка группы А и С.

некоторых случаях этот контроль может быть сцеплен с аллотипом и что в этих случаях идиотип может ассоциироваться с иммуноглобулиновым аллотипом.

Предлагаю рассмотреть эти темы по возможности отдельно; вначале просим Rajewsky рассказать о получении антиидиотипических антител у мышей.

Rajewsky. Может быть, сейчас было бы уместным обсудить работу моего коллеги Eichmann, изучавшего ответ у мышей против стрептококкового полисахарида.

На рис. 40 показаны результаты первой серии опытов, в которой различные инбредные линии мышей иммунизировались углеводами группы А и группы С.

Benacerraf. Иммунизировались ли мыши чистыми углеводами или контактными стрептококками?

Rajewsky. Мыши получали бактериальные вакцины. Можно заметить прежде всего, что между различными линиями отмечается резкая разница по количеству продуцируемых антител. Кроме того, некоторые линии вырабатывают больше антител против А, чем против С, другие наоборот. Следует заметить, что линии, несущие идентичные аллели H-2, значительно различаются между собой по ответу к углеводам. Однако различные линии различаются не только по количеству антител, образующихся при иммунизации, но также по гетерогенности иммунного ответа. Это становится ясным при анализе антисыворотки с помощью изоэлектрического фокусирования. Согласно данному критерию, у некоторых линий ответ на углеводы был весьма гетерогенным тогда, как у других линий, в частности, у линии А/Ж ответ был довольно гомогенным.

Eichmann смог пассировать основной клон антител мышей А/Ж по методу Askonas-Williamson несколько раз через облученных сингенных реципиен-

тов. Таким образом, можно получить достаточное количество гомогенных антител, чтобы у мышей A/J и у морских свинок выработались антиидиотипические антитела. У линии A/J при иммунизации стрептококками группы А у 4 из 5 мышей появились почти гомогенные антитела против углеводов, неразличимые при изоэлектрическом фокусировании и имевшие один и тот же идиотип. У одной мыши был получен гомогенный ответ, но результаты изоэлектрического фокусирования антител были иными и эти антитела имели только часть идиотипических детерминант, общих с остальными четырьмя животными. У двух других линий мышей CE/J и SWR/J не было обнаружено антител идиотипа, сходного с A/J, против углевода группы А. В настоящее время проводятся генетические исследования, чтобы определить характер наследования идиотипического маркера.

Председатель Wagner. На основании данных, которые приводит Rajewsky, создается впечатление, что явной ассоциации ответа с аллотипом не было. Сейчас Nisonoff расскажет нам об изучении идиотипической специфичности у конгенных мышей.

Nisonoff. Вместе с Pawlak, Hart, Ai-Lan Wang, а также Potter из Национального института здравоохранения мы изучали идиотипические специфичности антигаптеновых антител у инбредных мышей. Мы пользовались двумя гаптенами: пара-азобензоатом и пара-азофениларсонатом. Обычно мы иммунизируем мышей гемоцианином моллюска (KLH) в комплексе с гаптеном и в дальнейшем получаем гипериммунную антисыворотку высокого титра против гаптена. Затем антигаптеновые антитела преципитируются другим белком, с которым связан тот же гаптен для избирательной преципитации антигаптеновых антител. Этот преципитат отмывается и растворяется при pH 3,5. Возможно, таким образом высвобождается не весь антиген в комплексе, но преципитат растворяется. Растворенный преципитат вводится кролику или мышам другой линии.

Почти все эти исследования проводились с антиидиотипическими антителами, полученными у кроликов, которые получили 2—3 инъекции по 1 мг растворенного преципитата. В этих опытах почти неизменно продуцируются большие количества антител против мышинного IgG. Затем эти антисыворотки абсорбируются иммуноглобулином от мыши донорской линии и обычно также мышинной сывороткой. Есть различные указания на то, что абсорбированная антисыворотка специфична к идиотипам. Например, если абсорбировать антигаптеновые антитела из иммунной сыворотки мышидонора, то они уже не будут реагировать с антиидиотипическими антителами. Нормальная сыворотка мышидонора также не реагирует с антиидиотипическими антителами. Антитела к другим гаптенам или к другим белкам, полученные у той же линии мыши, также не реагируют. Таким образом, после абсорбции мы имеем антиидиотипические антитела, направленные против антигаптеновых антител мыши, от которой взят иммуноген.

Я хочу вкратце остановиться на трех разных темах. Первая из них — подавление проявления идиотипа. Можно подавить проявление специфического идиотипа путем введения мышам данного идиотипа специфических кроличьих антител. Это подавление продолжается до 5 мес. Вторая тема — сцепление идиотипа с аллотипом тяжелых цепей мыши (локализованном в области Fc). Третья тема — влияние замены носителя на идиотип антигаптеновых антител. Если ввести мышам A/J KLH-пара-азофениларсонат, то можно получить антитела определенной группы идиотипических специфичностей. Интересно установить, что происходит, если мышам той же линии иммунизируются тем же гаптеном, но на другом носителе. Получаются ли молекулы с родственными идиотипическими специфичностями? Наши самые

первые исследования, по-видимому, показывают, что обычно происходят сильные идиотипические перекрестные реакции внутри линии. На основании данных, которыми мы сейчас располагаем, мы склонны утверждать, что существование перекрестных реакций внутри линий не предсказуемо и зависит от антигена и от линии мышей.

ТАБЛИЦА 52

Количественное определение антиидиотипических антител с помощью подавления непрямо́й преципитации

Меченные ^{125}I специфически очищенные мышинные антитела (0,1—0,15 мкг)
 + тест-антисыворотка
 + избыток абсорбированной кроличьей антисыворотки
 + избыток козьих антител против кроличьего Fc (абсорбированных мышинной сывороткой)
 Контроль: А. Кроличьи антитела против овальбумина вместо кроличьих антимышинных антител
 Б. ^{125}I — нормальный мышинный IgG вместо меченых мышинных антител

Немеченая тест-сыворотка, содержащая такие же или перекрестнореагирующие идиотипы, будет подавлять преципитацию.

В табл. 52 показан метод, использованный для количественного определения специфических идиотипических антител. Мы вводим кроличью антиидиотипическую антисыворотку в реакцию с очищенными мышинными антителами, мечеными ^{125}I . Затем комплексы преципитируются козьими антителами против кроличьего Fc. Для контроля применяются кроличьи антитела к овальбумину вместо антиидиотипической антисыворотки или меченый нормальный мышинный IgG вместо меченых антигаптенных антител. В качестве ингибиторов связывания исследуются немеченые нормальные или гипериммунные сыворотки.

В табл. 53 показаны типы перекрестных реакций, которые мы наблюдали, например, у мышей линии A/J, у которых имеются весьма сильные идиотипические перекрестные реакции внутри линии. Практически каждая

ТАБЛИЦА 53

Перекрестнореагирующие кроличьи антиидиотипические антисыворотки, направленные против антигаптенных антител отдельных мышей

Линия	Гаптен	Внутрилинейные перекрестные реакции	Количество испытанных антисывороток
A/J	Азофениларсонат	Сильные	3
A/J	Азобензоат	Средние	4
BALB/c	Азофениларсонат	Очень слабые	4
BALB/c	Азобензоат	Средние	2
C57/BL	Азофениларсонат	Очень слабые	2

сыворотка от мышей A/J, иммунизированной KLN-азофениларсонатом, сильно реагирует с антиидиотипической сывороткой, приготовленной против соответствующих антител от одной мыши A/J. Это относится ко всем трем антисывороткам, исследованным нами до настоящего времени. При использовании антител мышей A/J, направленных к группе пара-азобензоата, перекрестные реакции внутри линии умеренно выражены. Иммунная сыво-

ротка почти от каждой мыши вступает в перекрестную реакцию, но обычно требуется значительно больше антител, чтобы вызвать ту же степень подавления непрямо́й преципитации, чем при использовании антител мыши донора.

Sela. Происходят ли идиотипические перекрестные реакции между антителами против фениларсоната и против бензоата?

Nisonoff. Нет. Когда мы меняем антигены, то перекрестных реакций нет совсем. Далее, если иммунизировать мышь КЛН-азофениларсонатом и абсорбировать антигаптеновые антитела, то антисыворотка теряет свою способность реагировать с антиидиотипической антисывороткой. Иными словами, оставшиеся антитела против части носителя не вступают в идиотипическую перекрестную реакцию с антигаптеновыми антителами.

Вернемся к системе А/Ј-азофениларсонат. Это лучшая из испытанных нами систем, так как идиотипические перекрестные реакции внутри линии весьма сильны. В этой системе для изучения антител любой мыши линии А/Ј, иммунизированной гаптеном азофениларсонатом, можно воспользоваться антиидиотипической антисывороткой.

Для того чтобы наблюдать подавление проявления идиотипа, можно приготовить фракцию кроличьих антиидиотипических антител, специфичных для антител А/Ј против азофениларсоната.

Benasegga. Какой процент этих антител вступает в перекрестную реакцию у данной линии?

Nisonoff. Можно подавить непрямо́ую преципитацию по крайней мере на 75—80%, пользуясь антителами к азофениларсонату почти от любой

ТАБЛИЦА 54

Подавление связывания 0,01 мкг антифениларсонатных антител мыши 413, меченных ^{125}I -антителами^а против идиотипа

Данные выражены в % от контрольного уровня

Нормальная сыворотка (10 мкл)	Кровь, взятая на 5-й неделе			Кровь, взятая на 11-й неделе		
	0,3	3	10 мкл сыворотки	0,3	3	10 мкл сыворотки
Контроль	95(2)	26(0)	23(3)			
	100(2)	76(7)	37(0)	56(0)	23(2)	
	95(2)	45(3)	22(0)	25(2)	7(3)	
	95(2)	41(0)	28(0)	41(0)	10(3)	
	102(1)	79(2)	28(1)	34(1)	17(1)	
	95(1)	59(0)	25(1)	36(4)	12(1)	
	102(2)	52(1)	28(1)	22(1)	8(1)	
	98(1)	50(5)	30(3)	22(3)	11(3)	
	98(1)	48(0)	29(3)	49(4)	12(1)	
	Подавление	91(6)		95(0)	87(5)	82(2)
97(1)			95(1)	88(1)	100(1)	90(2)
102(3)			90(0)	80(3)	90(1)	84(1)
96(2)			101(2)		91(2)	92(1)
100(0)			92(2)	81(3)	77(1)	75(2)
100(0)			93(1)	82(3)	93(3)	94(6)
100(0)			90(1)	88(2)	85(0)	84(1)
98(1)			96(0)	86(2)	84(6)	78(1)
109(3)			87(0)	77(3)	93(2)	82(1)

^а Все мыши, включая донора (№ 413), относятся к линии А/Ј. Непрямо́я преципитация была выполнена с кроличьей антиидиотипической антисывороткой и избытком козьих антител против кроличьего Fc.

мышь A/J. Если ввести внутрибрюшинно мышь кроличий антиидиотипический IgG дважды по 1 мг, то подавление продолжается несколько месяцев. Идиотип не проявляется при последующей иммунизации KLN-азофениларсоном, даже если можно обнаружить значительное количество антител против KLN и против фениларсоната.

В табл. 54 приведены некоторые данные о подавлении у контрольных мышей, получивших нормальный кроличий IgG. Идиотип у этих мышей проявляется через несколько недель и сохраняется во время последующей иммунизации. Антисыворотка «подавленных» мышей, получивших антиидиотипические антитела, были очень слабыми ингибиторами идиотипических реакций.

Herzenberg. Что означают цифры в скобках в таблице Nisonoff?

Nisonoff. Это сведения о расхождениях между опытами, проведенными дважды.

Benacerraf. Количество антител снижено и абсолютно?

Nisonoff. Наверняка мы не знаем, однако мы проводили тесты Ouchterlony и установили, что все «подавленные» мышь продуцируют ощутимое количество антигаптенных антител.

Cohn. В табл. 54 очень много нулей. Как получает Nisonoff нулевое среднее квадратическое отклонение?

Nisonoff. Нули означают определения, проведенные дважды, результаты которых совпали с точностью до 1%. Как видно из таблицы, подавление продолжалось минимум 11 нед, а у нескольких мышей до 5 мес.

Herzenberg. Нашел ли Nisonoff антитела против идиотипа у мышей через 5 или 11 недель?

Nisonoff. Я не могу ответить на этот вопрос, но у контрольных мышей количество продуцированных антител к идиотипу во много раз превышало способность антиидиотипических антител абсорбировать эти антитела.

Herzenberg. Разве не было бы легко проверить — имеются ли антитела к идиотипу у «подавленных» животных, пользуясь прямой преципитацией меченых антигаптенных антител?

Nisonoff. Это было невозможно, так как количество антигаптенных антител в сыворотке этих мышей слишком большое.

Uhr. Сохраняется ли в сыворотках таких мышей кроличий гамма-глобулин?

Nisonoff. Мы не пытались это установить. Однако мы искали мышьиные антитела против кроличьего глобулина и не нашли их.

На рис. 41 показаны результаты, полученные с конгенными мышьями, выращенными Potter. Здесь мы видим сцепление между аллотипом и идиотипом. Прежде всего ясно, что антитела к фениларсонату, полученные у мышей A/J, не вступают в идиотипическую перекрестную реакцию с антителами к фениларсонату мышей BALB/c. Каждое обозначение на рис. 41 относится к одной мышь. Антитела мышей AL/N против фениларсоната вступают в перекрестную реакцию с антиидиотипическими антителами внутри линии. Это обозначается черными треугольниками. Антиидиотипические антитела, приготовленные против антител мышей A/J к фениларсонату, вступают в перекрестную реакцию с антителами AL/N к фениларсонату. При использовании 10 мкг антител каждая антисыворотка подавляет реакцию по крайней мере на 70%. Остальные условные обозначения (не черные) относятся к конгенным мышьям, имеющим аллотип AL/N на генетической основе BALB/c. Эти мышь были 9 раз подвергнуты возвратному скрещиванию и они гомозиготны по аллотипу AL/N. Ясно видно, что все конгенные мышь, исследованные нами, имеют идиотип, антитела против кото-

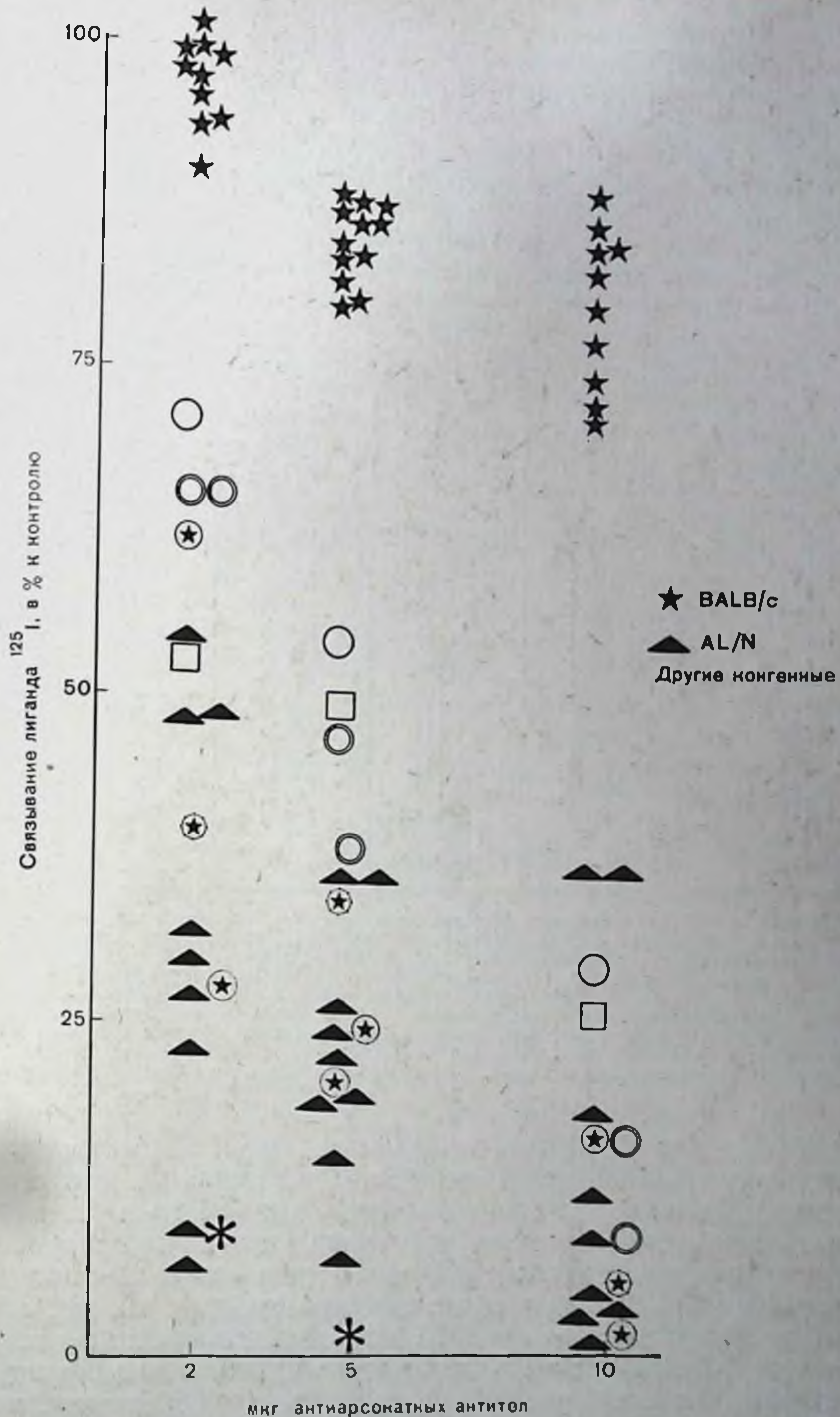


Рис. 41. Ингибция антиидиотипических антител против антиарсонатных антител у мышей А/Ж 413. Меченый лиганд является специфически очищенными антиарсонатными антителами мыши-донора. Данные показывают, что конгенные мыши, несущие аллотип линии А в противоположность мышам BALB/c, являются такими же эффективными продуцентами антиарсонатных антител как мыши AL/N в ингибции реакции связывания, в то время как антитела BALB/c неэффективны.

рого вступают в перекрестную реакцию. Это означает, что идиотипический маркер очень тесно сцеплен с аллотипическим маркером, который находится, как известно, на тяжелой цепи. Таким образом, ген V_H должен быть тесно сцеплен с геном C_H . Пока мы еще не знаем, в чем заключается роль легкой цепи.

Табл. 55 показывает, что можно изменить белковый носитель и все же получить идиотипические перекрестные реакции. Первоначальный донор

ТАБЛИЦА 55

Подавление различными антисыворотками связывания антител против азофениларсоната с антиидиотипическими антителами (линия А/Ј)^а

Немеченные ингибиторы — Цельная антисыворотка					
Антитела к → АФ Носитель → гемоцианин Линия → А/Ј	АФ БГГ А/Ј	азобензоат гемоцианин А/Ј	гемоци- анин — А/Ј	АФ гемоцианин BALB/c	АФ гемоцианин C57BL
Меченный ¹²⁵ I, связанный антиген (% от контроля)					
6(1)	8(1)	87(3)	86(0)	86(2)	80(3)
0(2)	6(2)	94(2)	88(1)	89(1)	85(3)
14(4)	18(2)	87(1)	83(3)	92(3)	89(4)
3(1)	8(2)	88(2)	88(2)	97(1)	75(6)
8(2)	2(1)	80(3)	90(1)	78(2)	85(3)
2(1)	44(5)	90(1)	84(4)	90(2)	90(2)
11(2)	18(1)	85(1)	89(2)	88(3)	88(1)
18(2)	24(3)	90(2)	82(1)	82(2)	82(4)
15(3)	59(4)	90(3)	85(3)	86(2)	82(2)
10(1)	10(3)	83(1)	86(4)	94(3)	85(3)
Дополнительные мыши А/Ј (12 мышей)	мыши (3—20)	(9—25) (5 мышей)			

^а Ингибция связывания 0,01 мкг очищенных меченных ¹²⁵I антител против азофениларсоната (АФ) от мыши № 413 линии А/Ј с антиидиотипическими антителами различными антисыворотками. Ингибиторами были немеченные цельные антисыворотки, каждая содержащая 20 мкг преципитирующих антигеновых антител. Антисыворотка против гемоцианина (4-столбец) всегда давала «сильные» преципитаты с гемоцианином, но содержание антител в ней не определялось. Каждая величина в таблице была получена с антисывороткой от отдельных мышей. В отсутствие ингибитора связывалось 55% меченого антигена. Эксперименты были выполнены дважды. Средние отклонения даны в скобках. Непрямые реакции преципитации были выполнены, используя меченые антитела мыши № 413 против АФ, кроличьи антиидиотипические антитела и избыток козьих антител против кроличьего Fc.

был иммунизирован КЛН-пара-азофениларсонатом. Антисыворотки, полученные против ВGG-р-азофениларсоната, дали сильные идиотипические перекрестные реакции, хотя для того, чтобы вызвать ту же степень ингибции потребовались большие их количества (данные не приведены). Поэтому можно полагать, что можно заменить носитель и все же стимулировать те же клоны клеток. Эти данные еще не окончательные, так как возможно, что антитела, полученные против ВGG-азофениларсоната, хотя и вступают в идиотипическую перекрестную реакцию, но не идентичны по структуре. Однако я считаю, что можно предложить более простое объяснение, а именно, что можно стимулировать одни и те же клоны клеток независимо от носителя — будет ли носитель КЛН или ВGG. На мой взгляд, это означает, что идиотип детерминируется на уровне В-клеток, а не Т-клеток, так как он, видимо, не зависит от носителя.

Председатель Warner. Думаю, что мы располагаем уже несколькими твердо доказанными примерами сцепленных с аллотипом генов иммунного ответа. Можно ли привести здесь какие-либо другие специфические данные

по этому вопросу? Затем мы перейдем к вопросу о том, имеются ли другие уровни контроля образования антител, связанные с аллотипом?

Cohn. Исследования, о которых я хочу вкратце рассказать, подробно описаны в ряде журналов: Blomberg, Geckeler and Weigert — «Science», 1972, v. 177, p. 178; Sher, Cohn, — «J. Immunol.», 1972, v. 109, p. 176, и т. д. Я хочу рассмотреть здесь два примера весьма ограниченного по гетерогенности ответа у мышей на сложные антигены: декстран В-1355S, содержащий цепи, подобные α -1,3, α -1,6 и α -1,4, пневмококковый С-углерод, содержащий дидеоксиглюкозу, N-ацетил галактозамин фосфат, фосфорилхолин и т. д.¹

Я хочу доказать, что мышинные линии, распознающие одну и ту же иммуногенную группу этих антигенов, т. е. α -1,3-глюкозид, с одной стороны, и фосфорилхолин — с другой, различаются по структуре антител. Эти структурные различия обусловлены локусом, сцепленным с маркером аллоти́па константой области тяжелой цепи (C_H), очевидно, геном V_H . Кроме того, уровень ответа связан со структурным полиморфизмом. Это означает, что V-гены зародышевой линии могут контролировать реактивность, что весьма интересно с точки зрения теории разнообразия. Далее, различие по реактивности обусловлено локусом, проявляющимся в В-клетках.

Основным реагентом является антиидиотипическая сыворотка, направленная против стандартного миеломного белка. При изучении ответа на декстран стандартным миеломным белком служит IgA, J558 со специфичностью к нигерозе α -1,3, глюкозиду одной из повторяющихся единиц в декстрани В-1355S. При изучении ответа на С-углевод стандартным миеломным белком является IgA, S107 со специфичностью к фосфорилхолину. Абсорбированные соответствующим образом антиидиотипические сыворотки взаимодействуют с миеломным белком и это взаимодействие снимается при добавлении специфического антигена. Это явление было описано Nisonoff.

Примерно у 1% мышей BALB/c с индуцированной миеломой образуется иммуноглобулин, специфичный к α -1,3-декстрану; еще у 1% мышей наблюдается специфичность к фосфорхолину. Миеломные белки, реагирующие с α -1,3-декстраном, всегда относятся к классу λ , имеющей особую последовательность и аналогичный идиотип. Однако миеломные белки, реагирующие с фосфорилхолином, все относятся к классу K, но лишь 80% имеют K-цепи той же подгруппы с аналогичным идиотипом. Эти белки обладают наибольшей способностью к связыванию. При иммунизации мышей BALB/c образуются антитела, ограниченные «сцеплением» с α -1,3 при ответе на декстран или с фосфорилхолином при ответе на С-углевод. Весь ответ принадлежит к классу IgM даже после многих недель повторных иммунизаций и остается ограниченным.

¹ Знакомясь с тем, что говорит Cohn о связи иммунного ответа на декстран и пневмококковый полисахарид с аллотипом иммуноглобулина, читатель должен знать происхождение рекомбинантных инбредных линий, упоминаемых в табл. 58, а также тот факт, что у мыши 95% легких цепей относятся к классу K, а легкие цепи λ занимают очень небольшое место в нормальном иммунном ответе. Рекомбинантные инбредные линии, упомянутые в табл. 58, выведены путем скрещивания мышей BALB/c и C57BL/6. Из поколения F_2 были отобраны пары для скрещивания и, таким образом, было выведено 7 новых инбредных линий, каждая из которых имеет новую комбинацию генов, полученных от родительских линий C57 и BALB/c. При типировании каждой из этих линий можно определить галотип H-2 и иммуноглобулиновый аллотип каждой новой рекомбинантной инбредной линии. Затем иммунизация этих рекомбинантных инбредных линий декстраном позволяет определить связь иммунного ответа на декстран с гаплотипом H-2, иммуноглобулиновым аллотипом или отсутствие связи с какой-либо группой сцепления. — П р и м. р е д.

ТАБЛИЦА 56

Специфичность иммунного ответа к декстрану

Линия мышей	Бляшки/10 ⁶ клеток селезенки, испытанные на:		
	В-1355S-эритроциты барана (ЭБ)	В-512S-ЭБ	ЭБ
BALB/c	1580	5	3
C57BL/6	465	32	33

Декстран В-1355S — разветвленный полимер (молекулярная масса $\approx 3 \times 10^7$), содержащий 57% α -1,6, 35% α -1,3 и 8% α -1,4 боковых цепей. Декстран В-512S содержит 95% α -1,6 и 5% α -1,4 подобных цепей; α -1,3 определены не были.

Мыши были иммунизированы декстраном В-1355S в полном адьюванте Фрейнда, реиммунизированы на 7-й день 10 мкг декстрана в неполном адьюванте Фрейнда и на 12-й день испытаны методом образования бляшек. Эритроциты для теста были сенсibilизированы или декстраном В-512S (без α -1,3 связей) или декстраном В-1355S (с α -1,3-связями). Эритроциты, сенсibilизированные В-512S, агглютинировались γ Ак миеломными белками с активностью против декстрана (не против α -1,3-глюкозила), демонстрируя, что детерминанты на В-512S доступны. У неиммунизированных мышей выявлялось менее чем 13 бляшек/10⁶ В-1355S-чувствительных клеток, поэтому фоновый уровень бляшек учитывался в этой и последующих таблицах.

Рассмотрим прежде систему с использованием декстрана. Как видно из табл. 56, мыши BALB/c сильно отвечают, а мыши C57BL/6 слабо отвечают на него. Разница между ними вначале довольно большая (через 5 дней, как указано в табл. 57), но затем постепенно исчезает по мере того, как продолжается иммунизация (табл. 56). Это вполне понятно, как и поясню ниже. Основное значение данных табл. 56 заключается в том, что у мышей BALB/c и C57BL/6 наблюдается ответ только против α -1,3-декстрана, хотя они иммунизировались декстраном В-1355S, имеющим цепи α -1,6 и α -1,4. Реакция с декстраном В-512S (лишенным цепи α -1,3) не выше, чем реакция на одни бараньи эритроциты.

Сильно отвечающие линии (например, BALB/c₁, упомянутые в табл. 57) продуцируют антитела класса λ , несущие идиотипическую детерминанту

ТАБЛИЦА 57

Реакция различных линий мышей на α -1,3-глюкозил в декстране

Линия мышей	Бляшки/ 10 ⁶ клеток 5-й день (среднее) ^a	H-2 ^b	Аллотип ^a	Класс L-цепей	Идиотип
BALB/c	1710	d	BALB/c	λ	J558
129	1635	b	BALB/c	λ	J558
C58	685	k	BALB/c	λ	J558
F ₁ (BALB/c × C57BL/6)	1140	d/b	BALB/c	λ	J558
(C57BL/6)	110	b	C57BL/6	k	не J558
SJL	40	s	C57BL/6	k	HT ⁶
CBA	41	k	BALB/c	k	HT
LKR	40	k	AL	k	HT
L/He	10	a	AL	k	HT
NZB	33	d	AL	k	HT

^a Диапазон для BALB/c (20 мышей) — 1000 — 2800 БОК/10⁶, для C57BL/6 (15 мышей) — 50 — 160 БОК/10⁶.

^b Не тестировано.

стандартного миеломного белка F558. Слабо реагирующие линии, например C57BL/6, продуцируют антитела класса К, лишенные «стандартного» идио-типа. Гибрид (BALB/c × C57BL/6)F₁ отвечает сильно, подобно мышам BALB/c, и продуцирует антитела класса λ, несущие «стандартный» идио-тип. Таким образом, способность к ответу является доминантным призна-ком, и как и следовало ожидать, продуцируемые антитела подобны анти-телам BALB/c. Я привожу табл. 56 главным образом, чтобы показать, как трудно говорить о сцеплении на основании изучения линий. Мыши BALB/c и NZB имеют один и тот же гаплотип H-2, но линия BALB/c отвечает сильно, а линия NZB отвечает слабо. Это говорит о том, что ответ не сцеплен с H-2. Мыши BALB/c и CBA имеют один и тот же аллель локуса аллотипа тяжелых цепей, но различаются по способности к ответу. Поэтому можно полагать, что ответ не сцеплен с детерминантами тяжелых цепей. Этот вывод, кстати, неверен, как мы увидим ниже. Возможно во время инбридинга мышей CBA или BALB/c, еще не достигших гомозиготности, рекомбинация разделила ген V_H и ген аллотипа C_H.

Табл. 58 доказывает, что и идиотип и способность к ответу сцеплены с аллотипом тяжелых цепей. Дело в том, что здесь использованы рекомбинант-

ТАБЛИЦА 58

Связь иммунного ответа против декстрана с аллотипом тяжелых цепей

Локус	Рекомбинантные инбредные линии ^а						
	C×VD	C×VE	C×VG	C×VH	C×VI	C×VJ	C×VK
H-2	C	B	B	C	B	B	B
C _H ^б	B	B	C	B	B	C	B
Ответ на декстран ^в	B	B	C	B	B	C	B

^а С-аллель BALB/c, В-аллель C57BL/6.

^б Аллотип тяжелой цепи.

^в Мыши были испытаны на их ответ к декстрану через 5 дней после иммунизации с помощью реакций гемагглютинации или бляшкообразования. Ответ линий C×VG и C×VJ можно было подавить (80—100%) антиидиотипической антисывороткой, направленной против миеломных антител J558.

ные инбредные линии между BALB/c и C57BL/6. Производится инбридинг случайно избранных пар из поколения F₂. Можно сказать, что мы создаем клоны мышей F₂. Затем линии исследуются на гены от BALB/c(C) или от C57BL/6 (B), которые они несут. Можно убедиться, что способность к ответу на декстран сцеплена с аллотипом тяжелой цепи, а не с комплексом H-2, так как фенотип ответа В или С соответствует аллотипу В или С, а не гаплотипу H-2. Например, линия C×В несет H-2 (тип С) и ответ на декстран типа В. Следовательно, ответ на декстран и комплекс H-2 не сцеплены. Сцепление ответа с аллотипом тяжелых цепей было подтверждено возвратным скрещиванием и было определено, что расстояние между локусами отве-та на декстран и аллотипа тяжелых цепей составляет около 1% пере-креста.

На основании этих данных можно сказать, что ответ на α-1,3-декстран детерминируется геном V_H зародышевых клеток, тесно сцепленным с C_H. Продукт этого гена дополняет субъединицу V_λ зародышевых клеток у сильно отвечающих мышей BALB/c, продуцируя иммуноглобулин, имею-щий специфичность к декстрану α-1,3. Иными словами, это специфичность иммуноглобулина, кодируемого генами зародышевых клеток. Для того что-

бы проявилось высокое связывание α -1,3-декстрана необходимо, чтобы аллель V_H зародышевых клеток у мышей C57BL/6, дополненный субъединицей V_λ , претерпел одну или несколько мутаций. Следовательно, первоначальный ответ относительно медленный по сравнению с ответом мышей BALB/c. В дальнейшем мыши C57BL/6 «догоняют» мышей BALB/c.

Теперь рассмотрим ответ на с-углевод. Я не буду говорить об уровне ответа в этом случае, остановлюсь только на идиотипе продуцируемых антител. Антитела к фосфорилхолину, продуцируемые у мышей А и BALB/c, совершенно одинаковы по аффинитету, тем не менее антитела мышей А можно отличить по идиотипу от антител BALB/c.

В табл. 59 вкратце изложены результаты изучения селекционированных линий конгенных по локусам H-2 и C_H . Установлено следующее:

ТАБЛИЦА 59

Связь иммунного ответа против фосфорилхолина с аллотипом C_H ^а

Линия мышей ^в	H-2 тип	Аллотип C_H	Фенотипический ответ ^б
BALB/c	d	a	+
C57BL/10	b	b	+
A/WY, A/J	a	e	-
AL/N	a	d	-
C.AL	d	d	u
A.BY	b	e	u
B10.A	a	b	+

^а C.AL конгенна с BALB/c, но несет аллотип локуса C_H от AL/N. A.BY конгенна с A/WY, но несет H-2 от C57BL/10. B10.A конгенна с C57BL/10, но несет H-2 от A/WY. Данные об этих конгенных линиях можно найти у Sher и Cohn, 1972.

^б Идиотип ответа определяется как процент подавления выраженности бляшкообразующих «центров» антиидиотипической сывороткой, приготовленной против антифосфорилхолина миеломного белка (S107) и использованной в лимитирующем разведении, дающем 90% подавления бляшек BALB/c.

(+) — идиотип, неотличимый от BALB/c, например C57BL/10.

(-) — идиотип, отличный от BALB/c, например A/WY.

(u) — идиотип, промежуточный между BALB/c и A/WY.

1) BALB/c и C57BL/10 не различимы по идиотипу антител к фосфорилхолину; они обозначены знаком плюс;

2) мыши A/WY, A/J и AL/N не несут стандартного идиотипа на своих антителах к фосфорилхолину; они обозначены знаком минус;

3) мыши C.AL, конгенные с BALB/c, за исключением локусов тяжелых цепей, которые имеют тип AL/N, занимают промежуточное место: структурная основа в этом случае еще не изучена.

Линии со знаком плюс характеризуются тем, что антиидиотипическая сыворотка в стандартном разведении подавляет бляшкообразующие клетки менее чем на 85%. Линии со знаком минус никогда не демонстрируют более чем 20% ингибиции. У промежуточной линии величина подавления составляет от 40 до 70%. При изучении разброса величин мы убедимся, что у мышей линии плюс или минус эти величины не совпадают с промежуточной категорией. Такой же результат как у мышей C.AL получен у мышей A.BY.

4) Конгенная линия B10.A, несущая комплекс H-2 от отрицательной линии (A.WY) и C_H -локус положительной линии (C57BL/10), является положительной. Это означает, что по идиотипу антител против фосфорилхолина она не отличима от C57BL/10 или BALB/c. Ясно, что антитела, не-

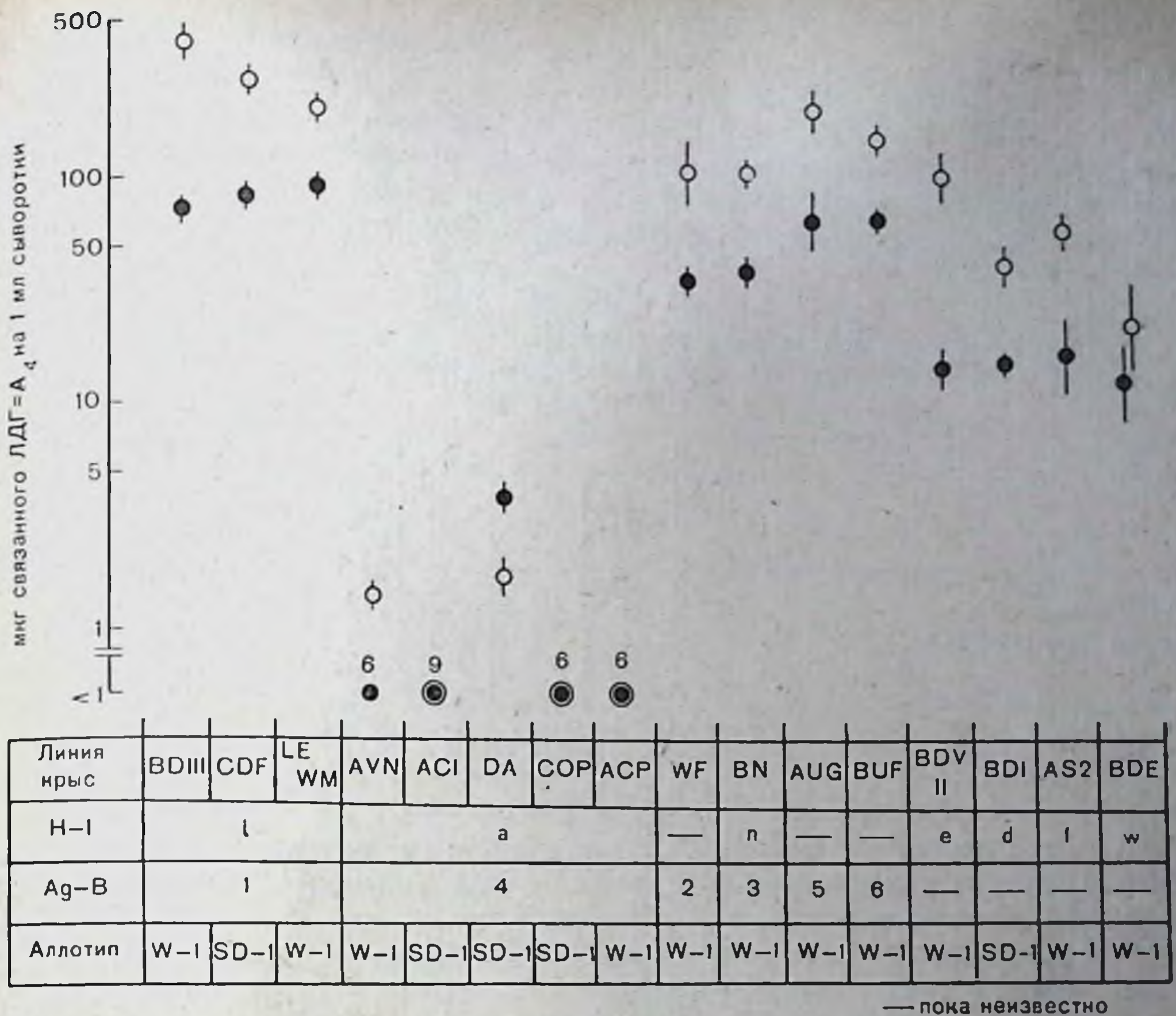


Рис. 42. Иммуный ответ на ЛДГ-А₄ свиньи у различных линий крыс. Темные кружки демонстрируют титры антител после первичной, а светлые — после вторичной иммунизации.

сущие только соответствующую тяжелую цепь, действуют как идиотип со знаком плюс, а антитела, несущие только соответствующую х-цепь, имеют промежуточный идиотип. Я могу сделать следующие выводы:

1) детерминирование идиотипа может зависеть от двух генетических факторов — один из них сцеплен с тяжелыми цепями, а сцепление другого неизвестно;

2) поскольку этот ответ связан с х-цепью и изучается идиотип, можно допустить, что два фактора являются генами V_H и V_x ;

3) можно с большей или меньшей уверенностью предположить, что одним из факторов является V_H ген, что касается того, что другим фактором является V_x ген, сцепленный с H-2, то это слабо обоснованное предположение основано только на промежуточном фенотипе мышей А.ВУ. Возможны и другие объяснения.

Возвратное скрещивание подтвердило сцепление одного из факторов с S_H -аллотипом, а также существование второго фактора. Однако, сцепление этого второго фактора пока не изучено.

Uhr. Удалось ли Cohn абсорбировать антиидиотипическую активность изолированными тяжелыми или легкими цепями?

Cohn. Нет, это не удалось.

Rajewsky. Я хотел бы рассказать здесь об 1—2 интересных фактах и прокомментировать эту дискуссию. Факты касаются возможной связи

легких цепей κ с упомянутым здесь Ig-локусом. Wurzberg в моей лаборатории создал систему иммунного ответа на крысах, в которой ответственность на лактатдегидрогеназу свиньи сцеплена с главной системой гистосовместимости (рис. 42). Однако не было найдено сцепления с аллотипическим маркером легких цепей, который по всей вероятности находится на легких цепях κ (табл. 60). Мой комментарий состоит в том, что новое в данных

ТАБЛИЦА 60

Связь ответа против лактатдегидрогеназы — A_4 с главной системой гистосовместимости (H-1) и иммуноглобулиновым аллотипом у гибридов F_2 крыс

	H-1			Аллотип		
	aa	al	ll	SD/SD	SD/W	W/W
Сильно отвечающие	0	9	8	4	10	3
Слабо отвечающие	7	0	0	2	4	1

$$F_2 = LEW (H-1^l, W-1) \times DA (H-1^a, SD-1)$$

Cohn — это не сцепление idiotипов с аллотипом, так как мы уже знаем, что у кроликов аллотипы на фрагменте F_c и на фрагменте F_d тяжелой цепи сцеплены. Более важным я считаю тот факт, что описываемые Cohn и упоминавшиеся Nisonoff idiotипы, видимо, проявляются у любой линии. Это очень важно с точки зрения теории возникновения соматического разнообразия, например теории Jегге. Однако надо соблюдать осторожность и изучить больше idiotипов в разных конгенных комбинациях линий, чтобы установить, всегда ли проявление idiotипов не зависит от генетического фона гистосовместимости.

Cohn. Пока я не хочу останавливаться на этом вопросе. Думая, что вопрос о том, является ли Ig-1 локусом κ -цепей остается открытым, хотя, как уже говорилось, все имеющиеся данные говорят против этого. Имеются две конкурирующие гипотезы. У мыши Ig-1 кодирует либо κ -цепи, либо является новым локусом тяжелых цепей, продукт которого дополняет продукт κ -локуса. Необходимо исключить, что κ -локус является геном Ig-1, поэтому пока я предпочту воздержаться.

Председатель Wagner. Существует еще один, более специфический пример, заслуживающий внимания — сцепление аллотипа с генами иммунного ответа у конгенных мышей. Об этом нам скажет Herzenberg.

Herzenberg. Работа, о которой я расскажу вкратце, была проведена вместе с Benjamini, Cherry, Leung и Noble в связи с одним случайным наблюдением. Применение конгенных линий уместно почти для любого сравнения, так как если разница будет найдена, ее можно отнести на счет гена, дифференцирующего конгенные линии. В одном из многих опытов, которые провел Mitchell в нашей лаборатории в прошлом году, он воспользовался в качестве антигена белком вируса табачной мозаики (ВТМ) и получил парадоксальные результаты. Оказалось, дело в том, что иногда он пользовался для своего опыта одной конгенной линией, иногда же другой. Мы расследовали это наблюдение и установили, что если иммунизировать две конгенные линии мышей, CSW и CWB, цельным белком ВТМ и испытать полученные антитела против иммунодоминантного декапептида этого белка (с которым

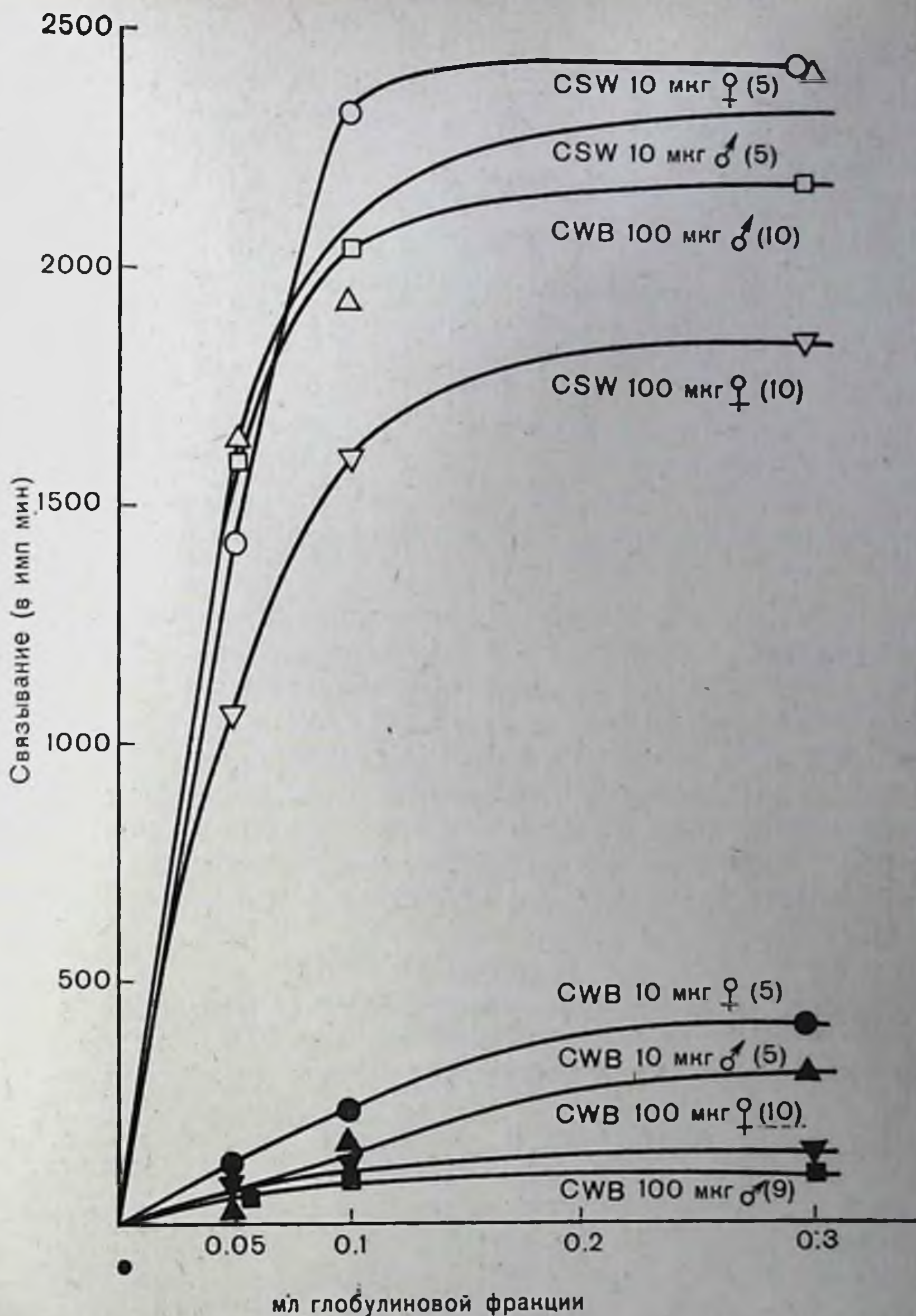


Рис. 43. Активность связывания декапептидов глобулинами конгенных мышей, различающихся только по Ig(C_H) области. Иммунизация проводилась белком ВТМ путем инъекции его в полном адьюванте Фрейнда в подушечку лапок, через 3 нед после инъекции водного раствора белка ВТМ (также в подушечку лапок). Сыворотка получена через 14 дней после повторной инъекции, глобулиновая фракция получена после осаждения сульфатом аммония, и связывание ¹²⁵I декапептидов измерялось методом Фагг. Число животных в группе дано в скобках (исследовались собранные вместе образцы сыворотки).

Венжаміні работал несколько лет), то мы наблюдаем у двух линий ответы, весьма различные по характеру антител к декапептиду.

На рис. 43 показаны различия между группами мышей. Мы хотели узнать, связаны ли эти различия с геном или генами, которые проявляются на Т- или В-клетках. Для этого мы изучали различные комбинации Т- и В-клеток. Однако результаты оказались далеко не столь ясными, как мы надеялись, поэтому мы приступили к изучению отдельных мышей. В табл. 61

ТАБЛИЦА 61

Ответ к декапептиду после иммунизации белком ВТМ.
Корреляция с аллотипом у конгенных мышей^a

Аллотип	Количество мышей			Всего	Сильно отвечающие, %
	сильно отвечающих ^b	слабо отвечающих	промежуточных		
a/a	17	1	1	19	90
b/b	7	59	2	68	10 ^в
a/b	34	41	5	80	43

^a Все мыши были СЗН.СВ, их конгенные партнеры СWB/13 или гибриды этих конгенных мышей.

^b Большинство мышей были четко сильно или слабо отвечающими (>20% или <8% связанного декапептида соответственно). Промежуточные имели уровень между этими двумя группами.

^в Если промежуточных включить как сильно отвечающих, то уровень становится 13%.

показаны результаты титрования сывороток ряда отдельных конгенных мышей с гомозиготным аллотипом Ig^a или гомозиготным аллотипом Ig^b и гетерозигот a/b. У большинства животных мы находили либо четкий сильный, либо слабый ответ с небольшим числом промежуточных ответов. Ясно, что абсолютной корреляции нет, в обоих направлениях корреляция составляет около 90%. Гетерозиготы наполовину оказались отвечающими и наполовину не отвечающими. Таким образом, у нас нет того ясного доминантного или рецессивного характера ответа, которое хотелось бы наблюдать. Мы изучили также ряд различных инбредных и конгенных линий.

ТАБЛИЦА 62

Ответ различных линий мышей к ¹²⁵I Тир-декапептиду после иммунизации 10 мкг белка ВТМ

Линия	Связывание декапептида (%) ^a	Аллели	
		Ig	H-2
CSW	47	a	b
NZB	36	e	d
A/J	34	e	a
LP/J	22	b	bc
SJL/J	16	b	s
CE/J	15	f	k
AKR/J	15	d	k
СЗН/HeJ	11	a	k
DBA/2J	9	c	d
B10/Sn	8	b	b
CWB/13	6	b	b
B10.D2	5	b	d
BALB/cN ^б	0	a	d
BAB/14	0	b	d
RIII/2J	0	g	г
B10 (коричневые)	0	b	b
B10.BR	0	b	k
B10.A	0	b	a

^a Процент связывания 0,01 мкг ¹²⁵I-Тир декапептида 0,3 мл глобулина (5 мышей в группе) на 14-й день вторичного ответа.

^б В ранее проведенном эксперименте BALB/c давали около 14% связывания декапептида после иммунизации 100 мкг ВТМ плюс В. pertussis в полном адьюванте Фрейнда.

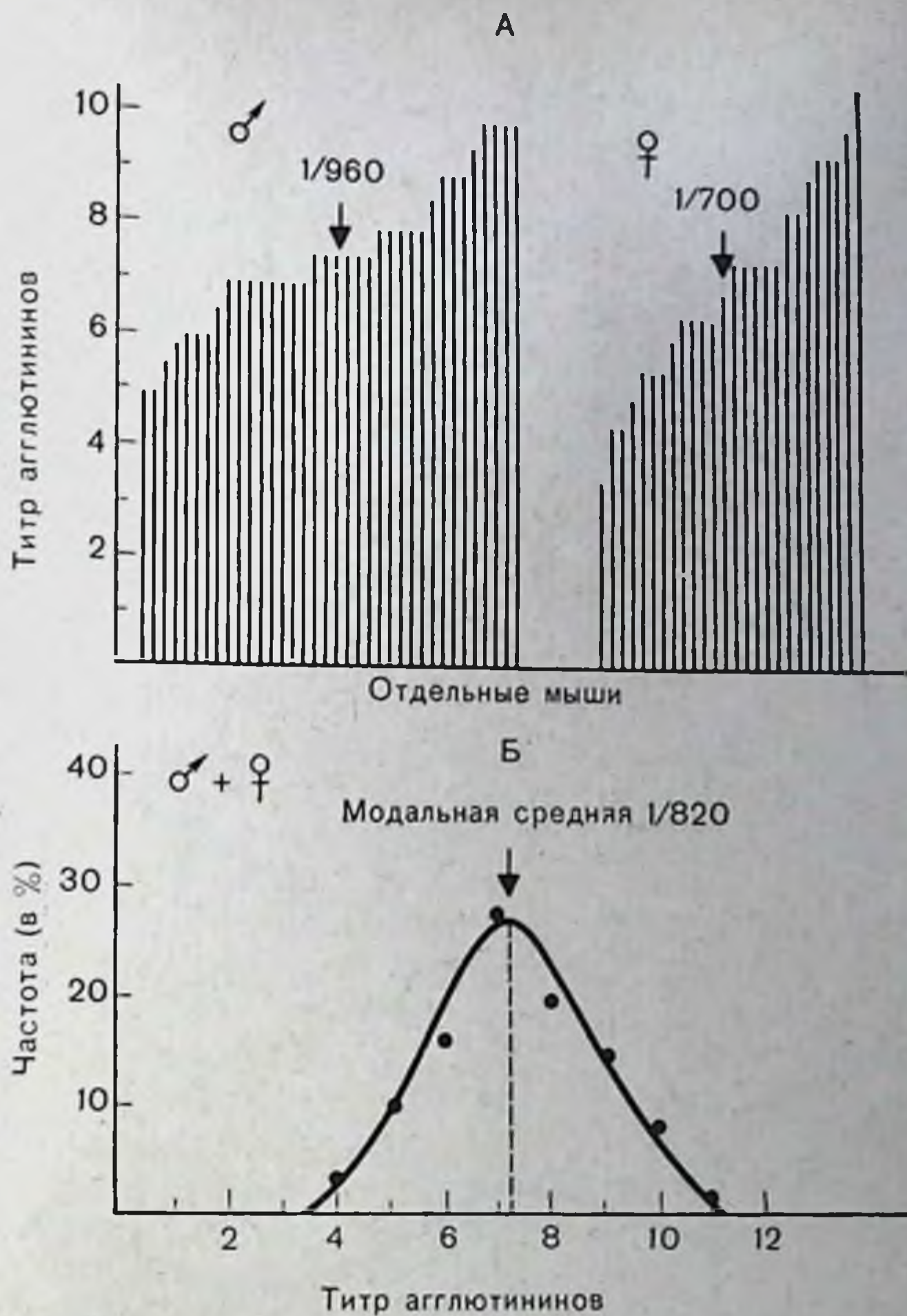


Рис. 44. Распределение агглютининов против эритроцитов барана в естественной популяции беспородных белых мышей.

Из табл. 62 видно, что иммунный ответ даже на такой относительно простой декапептид абсолютно не коррелирует с аллотипом иммуноглобулина и H-2. Однако мыши с аллотипом а в общем относятся к сильно отвечающим, кроме BALB/с. Все аллотипы b занимают место внизу таблицы, за исключением двух интересных линий LP и SJL. Ясно, что корреляция с H-2 далеко не абсолютна.

Председатель Вагнер. Можем ли мы без споров признать, что на этом этапе некоторые данные, полученные с аллотипами конгенных линий, показывают, что у разных инбредных линий существуют разные наборы V-генов, так что у некоторых линий нет определенных активных центров. Очевидно, эти V-гены сцеплены с С-областью. Как показывают данные о сцеплении аллотипа тяжелых цепей, это соответствует данным по сцеплению локусов а, d и e у кроликов. Безусловно, это одна из основных проблем, но если кто-либо не хочет высказаться еще на эту тему, я предлагаю признать, что некоторые иммунные ответы находятся под контролем генов V, проявляющихся на В-клетках. Можно также поднять вопрос о том, сколько различных иммунных ответов подчиняются генетическому контролю этого типа и сколько — генам иммунного ответа, сцепленным с H-2. Хотелось бы сейчас

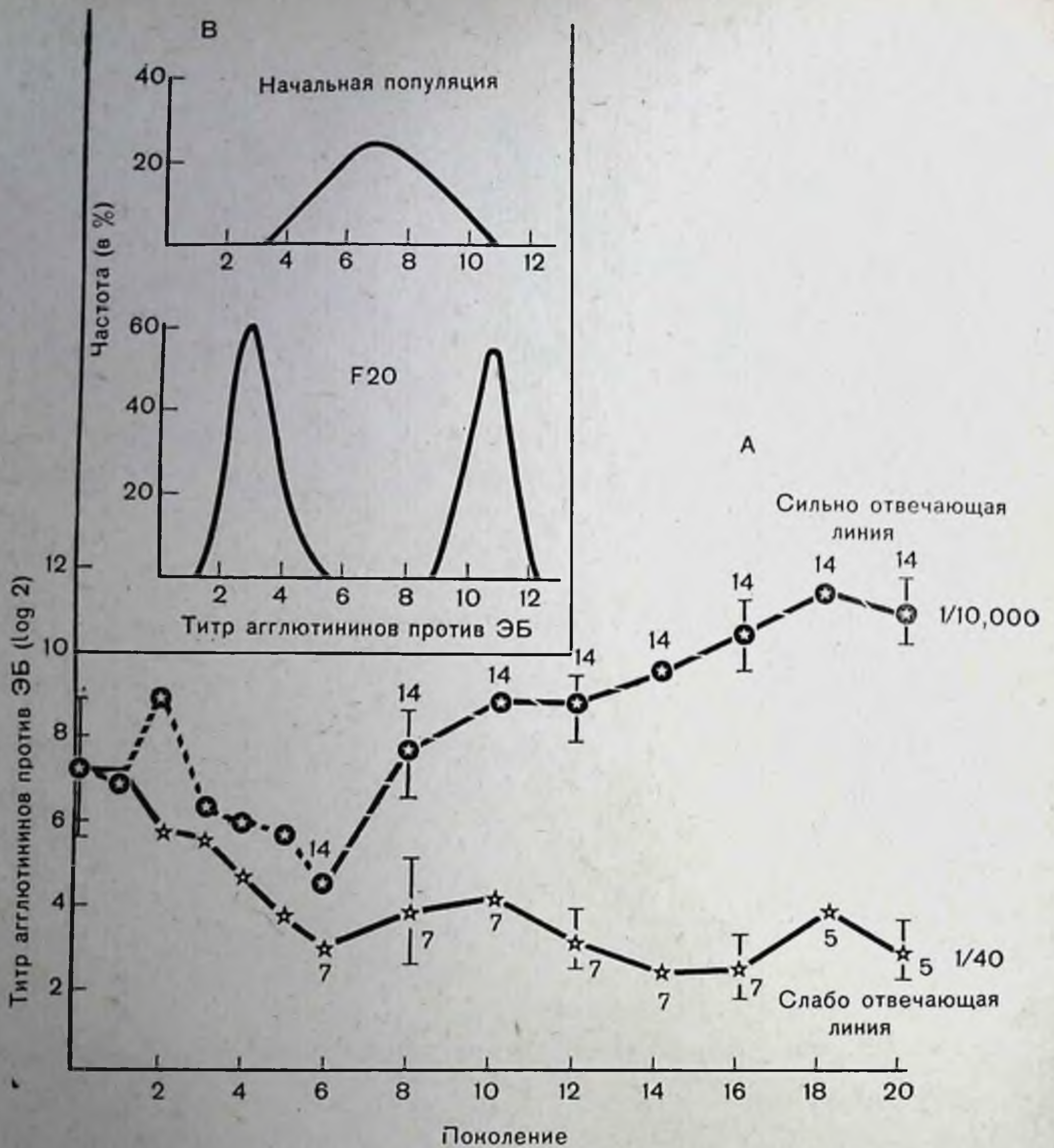


Рис. 45. Разделение сильно и слабо отвечающих мышей в процессе селекции.

обсудить вопрос о том, имеются ли еще какие-либо другие уровни генетического контроля, как это можно было предположить на основании работы Krause, посвященной гетерогенности синтеза антител и количества образующихся антител.

Рассмотрим сначала пример Biozzi, который выскажет здесь концепцию о том, что сцепление с аллотипом может быть связано более чем с одним специфическим гуморальным ответом.

Biozzi. Я хотел бы познакомить вас с моделью генетической регуляции синтеза антител, отличающейся от модели, которая включает гены специфического иммунного ответа. В действительности в нашей модели генетическая регуляция действует на уровне синтеза иммуноглобулинов независимо от их специфичности. Беспородные белые мыши иммунизировались внутривенно оптимальной дозой бараньих эритроцитов. У каждого животного определялся максимальный уровень образования агглютининов. Этот мак-

симальный уровень, выраженный в логарифмах разведения сыворотки \log_2 , рассматривается как фенотипический признак.

На рис. 44 показаны отдельные титры агглюцининов против бараньих эритроцитов у группы самцов и самок мышей; мы видим большую индивидуальную вариабельность без явных сцепленных с полом различий. Кривая частотного распределения этого признака среди всей популяции гармоничная: модальная средняя близка к средней арифметической. Из этой исходной популяции путем соответствующего селективного скрещивания были выведены линии сильно и слабо отвечающих животных. Схема селекционного выведения была подробно описана в другой работе. Разделение сильно и слабо отвечающих линий путем селекционного выведения продолжалось на протяжении 20 поколений (рис. 45). К тому времени, когда мы подошли к F_{20} , была достигнута заметная разница между линиями. Титр агглютини-на у сильно реагирующих животных составляет около 1:10 000, а у слабо реагирующих животных только 1:40. Разобщенность между линиями увеличивается. Примерно на 20-м поколении каждая линия становится гомозиготной по изучаемому признаку, так достигается максимальное разобщение между линиями и замечательная гомогенность соответствующих кривых частотного распределения. Постоянная вариабельность признака у первоначальной популяции и увеличивающаяся дистанция между линиями при селективном размножении указывает на полигенную регуляцию образования агглюцининов. Feingold и соавт. попытались вычислить количество генов, играющих здесь роль, на основании скорости расхождения линий и распределения признака при расщеплении у гибридов F_2 и возвратном скрещивании. Предварительные результаты показывают, что признак образования агглюцининов — это количественная черта, детерминируемая кумулятивным эффектом группы, включающей около 10 локусов.

Подробное изучение иммунной реактивности двух линий показало, что эта группа генов проявляется на В-лимфоцитах. Эти гены регулируют скорость размножения и дифференцировки клеток, образующих антитела после антигенной стимуляции (Biozzi e. a. «Progress in Immunology», 1971, v. 1, p. 529 и «J. Exp. Med.», 1970, v. 132, p. 752). Вызванные антигеном пролиферация и дифференцировка лимфоцитов представляют собой общее явление, не связанное с антигенной специфичностью, поэтому можно было предсказать, что слабо отвечающие и сильно отвечающие линии будут различаться по своей иммунной реактивности на любой из нескольких антигенов. Действительно, это подтвердилось для многих антигенов, не вступающих в перекрестную реакцию, как показано в табл. 63. Разница между линиями по синтезу антител, изображенная на рис. 45, относится ко всем исследованным до настоящего времени антигенам и гаптенам включая, например, пневмококковый полисахарид, антигены гистосовместимости, пикриновую кислоту, бактериофаг T_4 и многие другие бактериальные антигены.

Различная способность синтезировать антитела у двух линий касается всех классов иммуноглобулинов. Lieberman изучила иммуноглобулиновые аллотипы, представленные в табл. 64. У выведенной сильно отвечающей линии были найдены иммуноглобулиновые аллотипы двух чистых линий, тогда как у мышей слабо отвечающей линии наблюдается гомозиготность по группе сцепления иммуноглобулиновых аллотипов, которых нет у инбридных линий. Эта ограниченность распределения аллотипов в двух линиях может детерминироваться либо сцеплением между локусом аллотипа и «количественным» локусом, расщепляющемся в каждой линии при нашем селективном выведении, либо кровным родством животных внутри линии

ТАБЛИЦА 63

Отвечаемость сильно и слабо отвечающих линий мышей
на различные антигены

Антигены	Пик сывороточных антител ^a		Метод
	сильная линия	слабая линия	
ЭБ	1/15000	1/80	РГА
Эритроциты голубя	1/7000	1/100	РГА
S. ty- / O соматический	1/500	1/30	РГА
phi / H флагеллярный	1/1000	1/60	РГА
Гемоцианин	1/400	1/10	РПГА
БСА	1/20000	1/30	РПГА
ДНФ-БГГ	1/200	1/80	РПГА ДНФ-ЭБ
Яичный альбумин	1/64	1/3	РСА

^a Первичный или вторичный ответ.

ТАБЛИЦА 64

Распределение иммуноглобулиновых аллотипов у сильно и слабо
отвечающих линий мышей

	Имуноглобулиновые аллотипы	
	сильная линия	слабая линия
Фенотипы	1) 8% BALB/c 2) 43% C ₅₇ BL 3) 49% (BALB/c × C57BL)F ₁	G(γ _{2a}) 3, 5, 7, 8 H(γ _{2b}) 9, 11 A(IgA) — (γ ₁)f Не существует у инбредных линий (дикие мыши)

При специальной селекции тесный инбридинг исключен, но вследствие того что из каждого поколения отбирается ограниченное число пар, кровь в значительной мере смешивается (замкнутая колония). Коэффициент инбридинга, вычисленный Feingold и соавторами, у мышей F₂₁ составляет около 0,55 у сильно отвечающей линии и 0,71 у слабо отвечающей линии.

Как видно из табл. 64, мы нашли положительную корреляцию между распределением иммуноглобулиновых аллотипов и ответами на бараньи эритроциты при расщеплении в F₂ между линиями. Такой корреляции не обнаружено у гибридов F₁, скрещенных возвратно с двумя родительскими линиями, как показано в табл. 65.

ТАБЛИЦА 65

Корреляция между иммуноглобулиновыми аллотипами и титрами
агглютининов против ЭБ у межлинейных гибридов F₂

Аллотип	Агглютинины против ЭБ (5 дней)
Гомозиготный слабо отвечающий 3,5/3,5	1/500 } p < 0,01 1/100 } 1/750
Гомозиготный сильно отвечающий 2/2	
Гетерозиготный (сильно отвечающий × слабо отвечающий)	

Количественная разница по образованию агглютининов, найденная при расщеплении в F_2 и возвратном скрещивании (табл. 65 и 66), является только частью разницы между гомозиготами сильно отвечающей и слабо отвечающей линии (см. рис. 45). Это означает, что только одна группа количественных локусов, расщепляющихся в каждой линии при селективном выведении, сцеплена с иммуноглобулиновыми аллотипами. Этот локус возможно тесно сцеплен с локусом, кодирующим специфичность аллотипа, но не обязательно находится в функциональной связи со структурными генами иммуноглобулиновых тяжелых цепей.

ТАБЛИЦА 66

Корреляция между иммуноглобулиновыми аллотипами и титрами агглютининов против ЭБ у мышей в возвратном скрещивании

	Аллотип	Титр агглютининов против ЭБ (5 дней после иммунизации)
F_1 × сильно отвечающую линию	Гомозиготный	
	Сильно отвечающий 2/2	1/1100
F_1 × слабо отвечающую линию	Гетерозиготный 2/3,5	1/7500
	Гомозиготный	
	Слабо отвечающий 3,5/3,5	1/130
	Гетерозиготный 2/3,5	1/250

Водмер. У меня есть замечание в связи со словами Biozzi о возможности сцепления с аллотипами, не имеющем функционального значения. Я думаю, что это очень маловероятно. Если бы даже было 20 хромосом и 1 шанс из 2, что 1 из 10 маркеров находится на хромосоме с маркером аллотипа, то этого еще недостаточно для обнаружения достоверной связи. Достоверная ассоциация не будет найдена, если сцепление не является достаточно тесным. Следовательно, я считаю, что если бы ассоциация действительно была, то очень маловероятно, что это лишь случайная ассоциация с маркером аллотипа.

Benacerraf. Возможно, из-за недостатка времени Biozzi не представил здесь всех данных, полученных в опытах с этими мышами и имеющих отношение к интересующей нас проблеме. У линии слабо отвечающих мышей было значительно меньшее количество иммуноглобулинов до и после иммунизации, чем у сильно отвечающей линии, почти по всем классам иммуноглобулинов. Эти определения провел Asofsky. В поколениях F_2 и после возвратного скрещивания не было никакой связи между группами сцепления аллотипа и уровнем иммуноглобулина у отдельных животных.

Председатель Вагнер. Мне кажется, что сейчас мы должны говорить о том, существует ли ассоциация генетического контроля образования антител с аллотипом, не имеющая ничего общего с набором V-генов. Быть может, Serpellini выскажется здесь о аллотипах b4 и b9 у кроликов, о том, существуют ли определенные аллотипы, связанные с многообразными дефицитами выработки антител.

Serpellini. Я хотел бы познакомиться с мнением специалистов по другому аспекту генетического контроля синтеза иммуноглобулинов, а следовательно, антител. Мой коллега Carbonega несколько лет назад обнаружил новый аллель Ab локуса кроличьих аллотипов, который, как выяснилось позднее, качественно идентичен Ab9 Dubiski. Мутант, найденный в кроличьей

колони в Турине, однако, характеризовался очень низким уровнем молекул Ab9 в сыворотке. У гомозиготных кроликов 9/9 был аномально низкий уровень общих иммуноглобулинов и высокий уровень легких цепей необычного рода (теперь известно, что это λ -цепи). У гетерозигот 4/9, 5/9 и 6/9 отношение между двумя аллельными продуктами было всегда неравным. В некоторых комбинациях на долю b9 приходилось только 10% всех λ -цепей. Специфические гуморальные ответы обычно по преимуществу имели другой аллельный тип, хотя иногда даже у гетерозигот наблюдался выраженный ответ с цепями b9. В общем вся эта ситуация весьма напоминала некоторые гемоглобинопатии, при которых аномальные гемоглобины также характеризуются дефицитом синтеза одной цепи. Все это соответствует общеизвестному факту, что каждый мутант имеет специфическую скорость синтеза, которая, видимо, связана с первичной структурой полипептидов. Однако уровни различных популяций молекул иммуноглобулинов в сыворотке довольно точно отражают наличие типов иммуноцитов в лимфоидных органах (если учесть катаболизм иммуноглобулинов и другие факторы). У гетерозиготных кроликов b4/9, исследованных Сагбопага, клеток b4, обнаруженных при иммунофлуоресценции в стимулированных лимфоузлах, было гораздо больше, чем клеток с аллотипом b9 (отношение было до 10:1). Это наблюдение позволяет думать, что «аллельное исключение» и вообще дифференцировка иммуноцитов в сторону того или другого из возможных типов иммуноглобулина может по крайней мере отчасти зависеть от первичной структуры, а следовательно, от относительной скорости синтеза различных тяжелых и легких цепей. Известно, что такое же отсутствие равновесия существует для субклассов λ (псевдоаллелей) у человека.

Как известно, аллотипы являются «постоянными», что вытекает из самого их определения, однако также можно рассуждать и в отношении активного центра антитела, которой характеризуется замещениями аминокислот. Если это так, то значит некоторые возможные антитела проявляются редко, вследствие особенностей и первичной структуры вариабельной части, из-за этого дифференцировка данного клона маловероятна. Это опять-таки может быть фактором, ограничивающим изменения нуклеотидов, рассматриваемые как в зародышевой, так и в соматической теориях.

Председатель Warner. Я думаю, что вопрос, поднятый Serpellini заслуживает дальнейшего обсуждения. Можно было бы привести новые примеры, например класс IgG у человека. Минимум три лаборатории доказали, что гомозиготы Gm5 имеют в общем вдвое больше сывороточного IgG₃, чем гомозиготы Gm21. Если допустить, что с некоторыми аллельными генами константной области связан дефицит количества иммуноглобулинов, то очевидно Serpellini хочет сказать, что мы должны различать истинную разницу по скорости синтеза этого аллельного продукта и избирательное наличие b4, например, по сравнению с b9 на поверхности клетки. Это возможно и в отсутствие антигенной стимуляции, поэтому необходимо разъяснить вопрос об избирательной ассоциации генов вариабельной области с b4, а не с b9.

Herzenberg. Эта история с b9 несколько запутала нас. Нет сомнения в том, что скорость образования иммуноглобулинов, принадлежащих к разным локусам, различна и что можно получить так называемое иммунологическое отклонение, т. е. изменение отношения образования скажем λ_1 и λ_2 в зависимости от метода иммунизации. Так называемые аллотипы b-локуса, как предполагалось, являются аллелями, но быть может они не настоящие аллели, а проявление разных генов. Отношение b4 к b9 у гетерозигот 4/9, например, можно изменить, обработав клетки *in vitro* анти-b9-

сывороткой в течение 24 ч, а затем введением их обратно аллогенным кроликам (Frensdorf и соавт. «Science», 1971, v. 171, p. 391).

Таким образом, можно резко увеличить образование b9. С другой стороны, есть способы подавить образование одного из аллотипов. Такое подавление хорошо доказано. Я не думаю, что здесь мы видим полную аналогию с талассемией, так как в отношении аллотипов вероятно все дело в том, что стимулирует деление этих клеток.

Cohn. Теперь все мы считаем, мне кажется, что V-гены и С-гены, кодирующие каждую субъединицу, тесно сцеплены и что V- и С-области находятся в цис-положении на хромосоме. Таким образом, одним из двух факторов, определяющих проявление С-гена, является то, с каким V-локусом он сцеплен. Mage ясно доказал, что имеется количественное соотношение между концентрацией или уровнем тяжелой цепи при исследовании с помощью генетического маркера константной области, расположенного в цис-положении от нее. Одним из факторов является V-локус, детерминирующий специфичности, которые могут быть распознаны. Другим фактором, детерминирующим уровень ответа, является переключение. Мы не знаем, какие факторы — гормональные или другие, определяют переключение клетки, продуцирующей IgM. Когда мы говорим, что данный класс тяжелых цепей, например IgG₃, связан с нечетными V-участками или присутствует в высокой или низкой концентрации в сыворотке, мы должны помнить об этих двух моментах.

Председатель Wagner. Иными словами, Cohn спрашивает, нельзя ли считать все остальные связанные с аллотипом эффекты также результатом генетического контроля иммунного ответа V-области. Таким образом, если обратиться к уровню IgG₃ у человека, то вопрос в том, обусловлен ли более высокий уровень IgG₃ у гомозигот Gm5 определенными специфическими антителами, находящимися под этим типом генетического контроля.

Cohn. Уровень IgG₃ у человека может быть обусловлен также каким-то гормональным эффектом или чем-то другим, неиммунологического характера. Кажущаяся связь уровня IgG₃ со специфической V-областью зависит, от какой хромосомы мы исходим. Мы не можем изучить эту связь, так как у человека нет V-маркеров. Если данная специфичность и данная функция связаны (например, резистентность к некоторым гельминтам и IgE), то происходит селекция V—С, обусловленная взаимодействием двух факторов.

Председатель Wagner. Надо заметить, однако, что пока неизвестно, может быть люди, сильно реагирующие на данный антиген, например флагеллин, сильно реагируют и на другие антигенные детерминанты.

Morris. Мне кажется, надо заметить, что так называемое сцепление между аллотипом Gm и ответом на флагеллин, в лучшем случае представляет собой очень слабую ассоциацию. Wells, Fudenberg и Maskau отобрали популяцию лиц сильно и слабо отвечающих на первичную иммунизацию флагеллином среди очень многочисленной группы иммунизированных. У слабо отвечающих людей был низкий естественный титр антител (меньше 100), а у сильно отвечающих высокий естественный титр антител (больше 600) и они давали сильный первичный ответ, состоящий преимущественно из IgM (более 10 000). У этих людей были найдены аллотипы Gm, a, x, b, g, f и была выявлена ассоциация между генотипом Gm, a, g (гомозиготы и гетерозиготы) и сильным ответом, едва достоверная на уровне 0,05. Однако после внесения поправочного коэффициента на число сопоставлений эта величина стала бы недостоверной. Таким образом, этот единственный возможный пример иммунного ответа, сцепленного с аллотипом у человека, в действительности

ти является сомнительным. Кстати, мы изучаем профили HL-A у той же группы испытуемых, и примерно половина группы уже обследована, причем пока не выявлено связи с ответом.

Serpellini. Я думаю, что возражения Herzenberg не по существу. Дело в том, что у гетерозиготных кроликов 4/9 количество свободных молекул в сыворотке и клеток в лимфоидных органах не равно по двум аллельным х-цепям. То же относится к λ_3 -цепям у гетерозиготных людей Gm^b/Gm^g . Вопрос состоит в том, объясняется ли это нарушение равновесия разной первичной структурой двух аллельных полипептидов в константной или в варибельной области. Как это сказывается на дифференцировке иммуноцитов?

Sohn предлагает другое объяснение, а именно, что вероятность выбора между двумя аллотипами зависит от варибельных генов, которые сцеплены с константной областью, несущей аллотип. Однако Mage обнаружил низкую, но достоверную частоту рекомбинаций между маркерами Aa (варибельной области) и Ad (в константной области) кроличьих тяжелых цепей. **Wodmer** несомненно скажет нам, что в общем процессе эволюции ввиду кроссинговера должны возникнуть всевозможные комбинации между аллелями сцепленных V- и C-генов. Таким образом, на уровне популяции мы не можем объяснить стабильный признак C-гена, исходя из свойств сцепленных V-генов, тем более мы не можем объяснить разные уровни субклассов λ_1 , λ_2 , λ_3 и λ_4 в одних и тех же V-областях.

Allison. Один из способов решения этой проблемы состоит в том, чтобы получить кроликов из других источников и проверить, насколько широко распространено данное явление.

Я хотел бы вернуться к поднятому Herzenberg вопросу об аллотипической супрессии. Возможно, что этот вид активного подавления встречается значительно чаще, чем мы думаем. Ранее на этой сессии был упомянут пример подавления проявления идиотипа инородными антителами. Известны также опыты по иммунизации овец БГГ в Эдинбурге, где **Sroepel**, который провел эти опыты, установил, что после короткого курса иммунизации получается хороший синтез антител. Однако, если иммунизация продолжается, эти антитела исчезают, что опять-таки указывает на какую-то активную регуляцию. Этот феномен заслуживает более пристального изучения, так как он может по-разному отразиться на некоторых аллотипах.

Herzenberg. Я хотел бы вернуться к данным, представленным ранее **Sohn**, так как они, на мой взгляд, крайне интересны. Думаю, что все со мной согласятся. Однако мы должны вновь признать, что ассоциации еще не доказаны, например сцепления V и C. Если рассмотреть данные **Sohn**, как они сформулированы, мы могли бы прийти к выводу, что структурные гены λ очень тесно сцеплены с генами константной области тяжелых цепей у мышей. Однако вполне возможно, что эта связь не обусловлена генетическим сцеплением, а объясняется детерминированием того типа легких λ -цепей, который будет вырабатываться, и тем, какие V-области тяжелых цепей предпочтительны при иммунном ответе этих животных.

Sohn. Эту гипотезу я не высказал, но данные, предъявленные мной, с ней совместимы. **Herzenberg** проницателен, и несмотря на то что я специально поручил своей секретарше записывать протоколы так, чтобы их невозможно было прочесть, он видит в них детали, незамечаемые другими.

Я хочу вернуться к этому сцеплению V и C при селекции тяжелых цепей. Возможно, что **Wodmer** прав и что в конечном счете аллельные V-локусы всей популяции были бы смешаны путем рекомбинаций. Однако многие из этих рекомбинантов могли бы быть летальны. Возможно, что необходимо

определенное количество разных функциональных V-генов зародышевых клеток, т. е. способных распознавать специфические антигены на патогенах того рода, о которых говорил Krause. Если та активность, закодированная в зародышевых клетках, будет утрачена, то селекция в процессе естественного отбора будет направлена против неответа животного. Я просто не понимаю свойств мышинных линий, описанных Biozzi. Если животное слабо отвечает на всё и все ответы сцеплены с аллотипом, то возникает невольно предположение о обширной делеции в V-области или о том, что V-структура извращена каким-либо другим образом.

Benacerraf. Отвечая на замечание Cohn, касающееся экспериментов Biozzi, я хочу сказать, что у линий мышей Biozzi с аллотипами тяжелых цепей была сцеплена только способность отвечать на бараньи эритроциты, которые являются основным антигеном, применяемым при селекции.

Я хотел бы задать вопрос Nisonoff. В его опытах, когда ему удалось подавить проявление идиотипа антиидиотипическими антителами у линии, иммунизированной конъюгатом гаптена, определял ли он аффинитет продуцируемых антител. Можно было бы предположить, что подавление антител, которые эта линия в норме продуцировала бы, должно привести к образованию антител более низкого аффинитета, чем в норме. Я хотел бы сделать еще одно замечание. В генетической системе, обсуждаемой на этой сессии, различия скорее были количественными, чем абсолютными и связанными со специфичностью антител, продуцированных в той или иной форме, что вполне естественно в этих сцепленных с аллотипом системах Ig-генов. Однако, я спрашиваю, можно ли пользоваться терминами — отвечающий и неответающий — для определения этих различий. Быть может более уместными были бы термины «избирательно отвечающие и неответающие животные».

Nisonoff. У нас заняло бы слишком много времени обсуждение всех деталей и всех данных. Но я хочу сказать сейчас, что если мы получаем антиидиотипические антитела против мышинных антигаптеновых антител, то они реагируют со 100% мышинных антител. В системе ответа против фениларсоната у мышей A/J типичная величина равна 60—80%. Я допускаю, что у мышей с подавленным иммунным ответом остальные 20 или 40% заменяют «подавленную» популяцию. У нас нет количественных данных о том, является ли замена полной, если не установлено, что происходит некоторое подавление синтеза антигаптеновых антител. С этой точки зрения мы исследовали пластинки Ouchterlony, приготовленные с использованием гетерологичного носителя с тем же гаптеном, чтобы установить, происходит ли у «подавленных» мышей линия ближе к лунке с антигеном или к лунке с антителами. Мы осмотрели многие пластинки, приготовленные с сыворотками «подавленных» или контрольных мышей, и не нашли большой разницы между двумя группами, поэтому я предполагаю, что общее подавление синтеза антигаптеновых антител невелико. Если нормальная популяция представляет собой просто случайную популяцию молекул, без индуцированных антиидиотипических антител, то возможно ее аффинитет примерно эквивалентен таковому подавленной популяции.

Cohn. Мне хочется ответить Benacerraf и вернуться к реакции на α -1,3-декстран. Среди животных есть слабо и сильно отвечающие. Если я воспользовался термином «неответающие» животные, то это не умышленная ошибка. В действительности я имел в виду сильный и слабый ответ. Я говорил, что существуют животные, сильно и слабо отвечающие на декстран, т. е. мыши BALB/c, с одной стороны, и C57BL, с другой, а у гибридов F₁ сильный ответ доминантен. К тому же могу сказать вам, что между антителами,

синтезируемыми при этих двух типах ответов, имеется структурная разница. Их тяжелые цепи различны, они имеют разные идиотипы.

Если бы я ничего не рассказал об этой системе, кроме того, что она сцеплена с H-2, то вы не смогли бы определить по фенотипу ответа, каким является сцепление. Неправильно говорить, что при ответах, сцепленных с H-2, мы рассматриваем сильно и слабо отвечающих животных, а при ответах, сцепленных с аллотипом, мы рассматриваем структурные различия или углеводов, или особых классов антигенов. Иными словами, при данном антигене, вызывающем сильный или слабый ответ, мы не можем сказать а priori, с чем будет сцеплен этот ответ.

Председатель Wagner. Теперь мы можем перейти к последней общей теме нашей дискуссии. Это последняя сессия, на которой будут рассматриваться различные типы генов иммунного ответа, поэтому основной вопрос, который еще стоит перед нами: имеются ли другие гены иммунного ответа, которые могут проявляться на других типах клеток, или хотя бы есть ли указания на генетический контроль иммунного ответа, не связанный с H-2 и с аллотипом? Думаю, что Sela может начать обсуждение этой темы.

Sela. Прежде всего я хотел бы дать общую ориентировку в проблеме генетического контроля на молекулярном уровне. Первые точные данные по генетическим различиям были получены с олигодетерминантными иммуногенами, т. е. с иммуногенами, которые содержат мало детерминант и по этой причине генетические различия были довольно четкими. В то время мы придерживались рабочей гипотезы, что генетические различия не ясно видны при использовании белков, так как они содержат мозаику разных детерминантов. Действительно, новейшие опыты, показывающие генетические различия между белками при использовании низких доз, представляют собой превращение сложного полидетерминантного белка в белок, в котором лишь один или несколько детерминантов иммуногенны. Следовательно, мы возвращаемся к олигодетерминантному иммуногену. Данные этого рода по существу были впервые получены Mozes и соавторами («J. Exp. Med.», 1969, v. 130, p. 1269) с полимером (Ф, Г)-Про--Л, причем они обнаружили равные количества антител у разных линий. Однако специфичность этих антител была различной, в одном случае она была направлена преимущественно против пептида, состоящего из фенилаланина и глютаминовой кислоты, а в другом против полипролина.

Я полагаю, что прямые доказательства этого феномена получены в наших недавних опытах по изучению особого участка нативного белка. Я хотел бы подчеркнуть, что это детерминанта, зависящая от конформации, в лизоциме куриного белка. Мы довольно много знаем об этой молекуле; известна как последовательность аминокислот, так и третичная структура. Нас интересует «петля», сцепленная с дисульфидным мостиком, которая является одним из самых иммуногенных участков молекулы (Agnon и соавт. «Proc. Nat. Acad. Sci.», 1971, v. 69, p. 1450). Для этих белков, кристаллографическая структура которых известна, характерно, что обычно имеется центр, где находятся наиболее иммуногенные детерминанты. Когда мы вводим лизоцимы ряду разных линий мышей, то у всех образуются антитела против лизоцима. Но если взять этот участок «петли», выделенный из лизоцима или синтезированный в лаборатории, и комбинировать его с синтетическим полимером, например полиаланином или полипролином, то у некоторых линий мышей антитела образуются, а у других нет (Mozes и соавт. «J. Immunol.», 1971, v. 106, p. 862).

Перед нами возник следующий вопрос: допустим, что линия вырабатывает антитела против лизоцима в ответ на лизоцим, но не вырабатывает

антител против «петли» в ответ на синтетический конъюгат петли с полимером; может ли у этой линии происходить выработка антител против «петли» после инъекции лизоцима? Как видно из табл. 67, мы получили отрицательный

ТАБЛИЦА 67

Иммунный ответ интактных мышей SJL и DBA/1 на «петлю» пептида лизоцима

Иммунизированный	Лизоцимом		Петля—А--Л		Петля—Про--Л	
Испытанный	Лизоцим	Петля	Лизоцим (Т, Г)-А--Л		Лизоцим (Т, Г)-Про--Л	
Линия SJL Линия DBA/1	Сильный Сильный	Слабый Сильный	Слабый Сильный	Слабый Слабый	Слабый Сильный	Сильный Слабый

ответ. Так, у линии SJL при введении петли в комплексе с полиаланином или с полипролином ответа (реакции с лизоцимом) практически не было. Напротив, когда мы вводили лизоцим линии SJL, то он вызывал сильный ответ, но ответ на «петлю» был очень слабым. Таким образом, линия SJL продуцирует антитела к другим детерминантам лизоцима, но не к детерминантам «петли». В табл. 67 сравниваются две линии мышей. Одна из них сильно отвечает на детерминанту «петли» независимо от того, является ли он частью нативного белка или синтетическим полимером. Можно прийти к выводу, что здесь мы имеем генетический контроль на уровне особых детерминант. В данном случае эти детерминанты зависят от конформации, так как если дисульфидный мостик «петли» будет раскрыт, то перекрестных реакций не появится.

Это напоминает мне первоначальное семейство разветвленных полимеров, с которыми McDevitt и я начали работать по изучению детерминант специфического генетического контроля иммунного ответа. Первые три полимера настолько принято обозначать с сокращениями, что очевидно большинство даже не знает, как они выглядят. Я имею в виду (Т, Г)-А--Л, (Ф, Г)-А--Л и (Н, Г)-А--Л. В этих полимерах носитель остается постоянным, поэтому было целесообразно перейти к другому носителю. Мы избрали полипролин и работали еще с двумя многоцепочечными полипептидами (Т, Г)-Про--Л и (Ф, Г)-Про--Л. Однако в новой «семье» все еще не было одного члена [я имею в виду (Н, Г)-Про--Л]. Это полимер, в котором пептиды L-гистидина и L-глутаминовой кислоты соединены с многоцепочечным поли-L-пролином. По веским причинам мы не смогли получить его раньше, но теперь нам удалось приготовить его.

Он оказался самым иммуногенным из всех шести полимеров. При первичной иммунизации он давал высокие титры агглютининов в отличие от остальных (табл. 68). В табл. 69 показан иммунный ответ различных линий. Я хочу подчеркнуть, что специфичность к (Н, Г) явно сцеплена с аллелем H-2^k, и у мышей H-2^b и H-2^s ответ слабый. С другой стороны, как уже известно из опытов с (Ф, Г)-Про--Л, ответ против полипролина не сцеплен с H-2 (этот ответ контролируется Iг-3). Кроме того, в этом случае некоторые линии мышей, например BALB/c или DBA/1 и SWR дают хорошие титры на исходные молекулы и очень слабые титры на (Н, Г)-

ТАБЛИЦА 68

Первичный ответ инбредных линий мышей на синтетические антигены, построенные на многоцепочечном полиаланине и на многоцепочечном полипролине

Линии мышей	Титры сыворотки после иммунизации			
	(Т, Г)-А--Л	(Н, Г)-А--Л	(Т, Г)-Про-Л	(Н, Г)-Про-Л
C3H.SW	1:4	< 1:4	1:8	1:32
C3H/HeJ	1:4	1:16	1:4—1:8	> 1:128
AKR/Cu	< 1:4	1:32	1:8—1:16	> 1:128
DBA/1	1:4	< 1:4	1:4—1:8	1:32

ТАБЛИЦА 69

Иммунный ответ инбредных линий мышей на (Н, Г)-Про--Л после вторичной иммунизации

Линия	Н-2	Титры сыворотки, определяемые с указанным антигеном		
		(Н, Г)-Про--Л	(Н, Г)-А--Л	(Т, Г)-Про--Л
A/J	a	> 1/128	1/32	1/64—1/128
C57BL/6	b	1/16—1/32	0—1/4	1/8—1/16
C3H.SW		1/32—1/64	1/4—1/8	1/32
DBA/2	d	1/32—1/64	1/8—1/16	1/16
BALB/c		1/64—1/128	1/8	1/16
C3H/HeJ	k	> 1/128	1/64—1/128	1/8—1/16
AKR/Cu		> 1/128	1/128	1/16
DBA/1	q	1/64	1/8—1/16	1/4—1/8
SWR		1/128	1/8—1/16	1/32
SJL	s	1/64	0—1/8	1/32—1/64

А--Л или (Т, Г)-Про--Л, что указывает на какое-то дополнительное осложнение. Таким образом, это хороший пример одной молекулы одного иммуногена с несколькими детерминантами, причем ответ на некоторые детерминанты сцеплен с Н-2, а ответ на другие детерминанты не сцеплен с Н-2.

Мне кажется, надо различать два варианта. С одной стороны, это реакция на полилизинные конъюгаты морских свинок линии 13 и полиаланиновые конъюгаты мышей SJL. По-видимому, морские свинки линии 13 слабо отвечают на любой детерминант, соединенный с полилизинном, а мыши SJL — с полиаланином. Таким образом, в этих условиях генетический контроль специфичен для носителя и не специфичен для детерминант гаптена. С другой стороны, при многих исследованиях, которые обсуждаются на этих трех сессиях, мы рассматривали генетический контроль, специфический для детерминант. Мне кажется надо помнить, что даже на одной и той же молекуле могут быть детерминанты с разным характером сцепления, что ведет к разным ответам.

Председатель Wagner. Ясно, ли, что ген Ig-3 не сцеплен ни с Н-2, ни с аллотипом?

Sela. Мне кажется, ясно, что он не сцеплен с H-2. В отношении ответа на (Т, Г)-Про--Л было также показано, что он не сцеплен с аллотипом (Mozes e. a. «J. Exp. Med.», 1969, v. 130, p. 493). Однако, мне кажется, что вопрос о том, сцеплен ли он с аллотипом, должен быть изучен подробнее.

Cohn. При изучении сложных генетических данных относительно реактивности на эритроцитарный антиген H-2.2 и (Ф, Г)-Про--Л у меня сложилось впечатление, что эти данные лучше всего объяснил бы двойной кроссинговер. Характер анализа этих данных и их изложение затрудняют решение вопроса о том, когда сцепление с аллотипом отсутствует, так как маскируется распределением другого фактора. В отношении (Т, Г)-Про--Л, по всей вероятности, ответ на фрагмент Т, Г сцеплен с H-2, а ответ на Про--Л может быть сцеплен с C_H аллотипом. Я не убежден, что сцепления с аллотипом нет. Так или иначе, было бы хорошо, если бы мы знали линии, которыми пользовались Mozes, Jatou, Sela и McDevitt.

McDevitt. Опыт ставился с мышами DBA/1 и SJL, с полимерами (Т, Г)-Про--Л и (Ф, Г)-Про--Л. Мы искали ассоциации между гаплотипом H-2 и иммуноглобулиновым аллотипом и способы продуцировать антитела против (Ф, Г) или Про--Л. Cohn прав, что, возможно, существует скрытая частичная связь с аллотипом, но данные в том виде, в котором они представлены, показывают, что при использовании (Ф, Г)-Про--Л иммунный ответ на Ф, Г сцеплен с H-2, а способность вырабатывать антитела к Про--Л не сцеплена с H-2 и не сцеплена с аллотипом. Мне кажется, что у Shearer есть некоторые данные о том, как обойти возражение с Ig-3 (антиполипролин), согласно которым маловероятно, что этот ответ сцеплен с аллотипом или H-2.

Shearer. Прежде всего я хотел бы высказаться о гене Ig-3 в связи с генетическими данными, опубликованными несколько лет назад Mozes, McDevitt, Jatou и Sela.

В то время при генетическом анализе возвратного скрещивания (DBA/1 × SJL) F_1 × SJL возникли некоторые дополнительные факторы, так как ответ у этих животных расщеплялся на промежуточный и слабый. Если допустить, что здесь действует простой мэнделевский генетический закон доминирования, то у животных, полученных при возвратном скрещивании, отвечаемость должна была бы быть сильной и промежуточной.

На основании этих старых данных было высказано предположение, что проявление этих генов связано с дополнительными факторами. После анализа поставленных экспериментов Mozes заметила, что мыши, полученные при возвратном скрещивании в этих опытах, были старыми, теперь она повторила эти генетические опыты на молодых мышах и, как показано на рис. 46, убедилась, что ответы потомства от возвратного скрещивания (DBA/1 × SJL) F_1 × SJL расщепляются на сильные и промежуточные. Хотя эти данные пока не опубликованы, есть основания полагать, что для данного гена Ig-3 не существует дополнительных генетических факторов и он видимо является единым геном. Далее я хочу заметить, что нас интересовал клеточный анализ ответа Ig-3 и данные о лимитирующих разведениях, которые я изложил на сессии 1-й совместимы с двумя гипотезами: либо ген иммунного ответа проявляется в В-клетках, либо он проявляется на уровне клеточного взаимодействия. В исследованиях, проведенных нами вместе с Вгаип, обработка поли-А:У слабо отвечающих мышей DBA/1 восстанавливала их иммунный ответ на (Т, Г)-Про--Л до уровня сильно отвечающей линии. Такая же обработка сильно отвечающих мышей SJL не давала эффекта. Такое же явление, т. е. превращение слабо отвечающих в сильно отвечающих животных, может быть вызвана при инъекции сингенным мы-

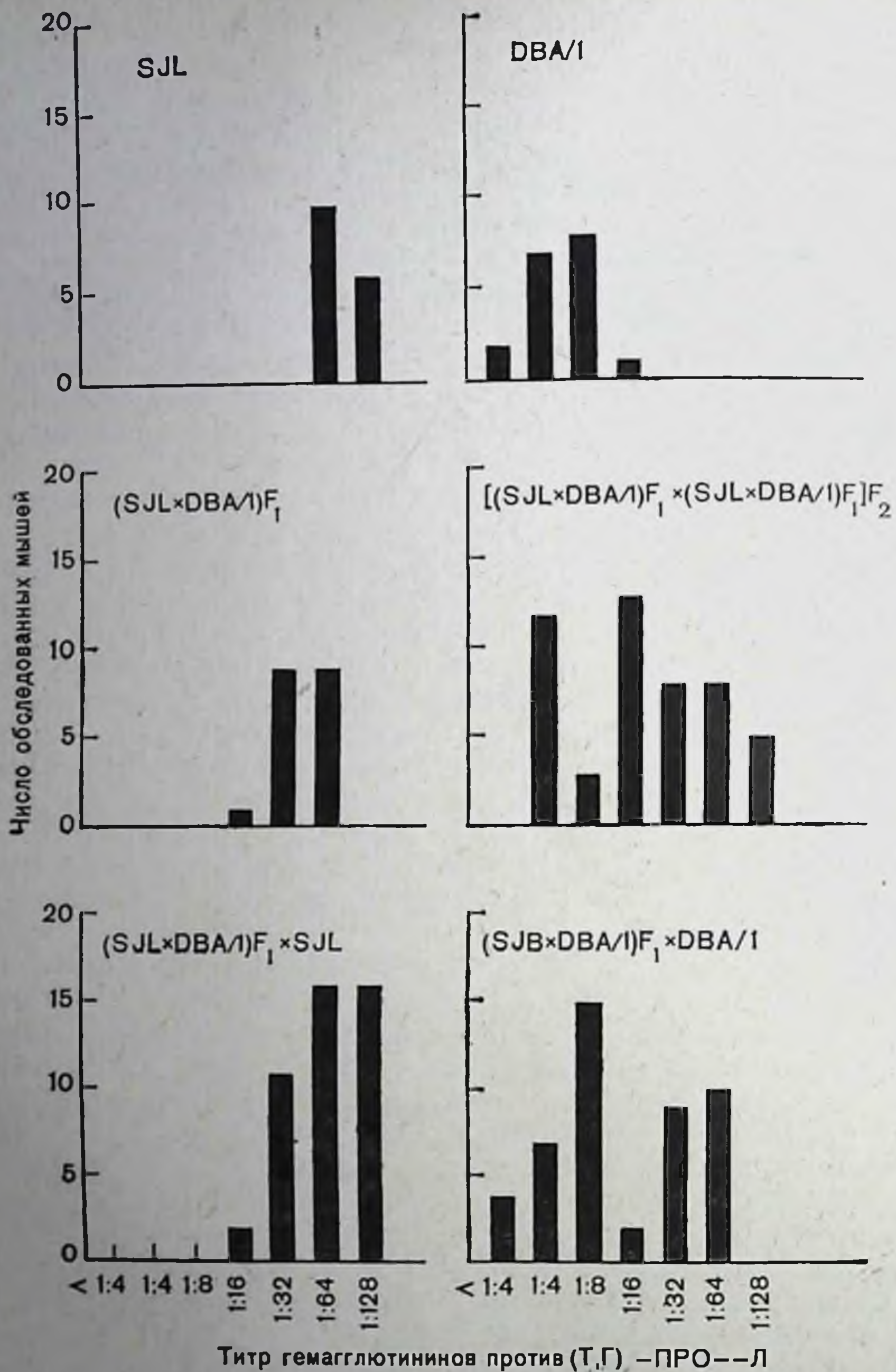


Рис. 46. Титры анти(Т,Γ)-Про--Л, гемагглютининов, как функция от числа мышей, тестированных на способность ответа по типу родителей, F_1 , F_2 и BC_1 .

шам DBA/1 клеток перитонеального экссудата или макрофагов слабо отвечающих мышей. На мой взгляд, эффект макрофагов и поли-А:У не специфичен. Таким образом, в настоящее время на основании клеточного анализа этого генетического дефекта мы полагаем, что данные с Ig-3 являются примером дефекта взаимодействия клетки с клеткой. Возможно, что у слабо отвечающих мышей DBA/1 имеется достаточное количество В-клеток, но по какой-то неизвестной причине эти В-клетки не активируются нормальным методом иммунизации. Таким образом, возможно нужны такие

стимулирующие факторы, как макрофаги, поли-А:У или другие неспецифические агенты для активации слабо отвечающих В-клеток.

Rajewsky. Я хочу уточнить, что Sheager говорит об эффекте, специфическом для детерминанты? Если это так, то быть может мы имеем то, к чему стремится Herzberg, выступивший на предыдущей сессии, а именно: ген иммунного ответа, влияющий на специфичность ответа В-клеток.

Sheager. В опытах с этими многоцепочечными синтетическими полипептидами я не хотел бы описывать иммунный ответ, пользуясь понятиями специфичности детерминанта, гаптенной специфичности или специфичности к носителю. Однако, по-видимому, ген Ig-3 действует на уровне специфического иммуногенного участка, возможно, на уровне антигенной детерминанты.

Председатель Wagner. Было бы хорошо, если бы сейчас Braun рассказал о некоторых особых наблюдениях, сделанных при использовании поли-А:У.

Braun. Как можно видеть из данных Biozzi и предполагать на основании данных, приведенных Sheager, степень иммунных ответов зависит не только от способности животных данного генотипа отвечать на специфический антигенный стимул, но и от неспецифических факторов, которые усиливают ответ иммунокомпетентных клеток на специфические антигенные стимулы.

Я хотел бы представить еще два примера различий, присущих «системам усиления». Первым, вполне очевидным, примером являются мыши NZB, у которых ответы на всевозможные антигены крайне высокие. Сейчас я хочу в связи со своими замечаниями упомянуть наблюдения Tabal, показавшего, что этот сильный ответ у мышей NZB может быть снижен до слабого (такого же, как у других линий) антагонистом адьювантного эффекта (который может быть получен у других линий с помощью поли-А:У). Это антагонистическое вещество представляет собой кинетинрибозид, который снимает у большинства других линий только ответы, стимулируемые поли-А:У, но ослабляет и нормальные ответы у мышей NZB. Второй пример касается различий между линиями по ответу на усиление поли-А:У, когда для иммунизации используется такой неочищенный антиген, как бараньи эритроциты. Из табл. 70 мы видим, что не только существуют общеизвестные различия между такими линиями, как С57, DBA, СВА, в отношении ответов на бараньи эритроциты, но к тому же, если ввести бараньи эритроциты вместе с усиливающим иммунный ответ поли-А:У, то усиление будет значительно больше у мышей DBA, чем у мышей С57 или СВА.

ТАБЛИЦА 70

Эффекты поли-А:У на ответы антител к ЭБ *in vivo*

Обработка селезенки доноров	БОК (10^8 клеток селезенки, 48 ч после иммунизации)		
	С57BL	DBA	СВА
ЭБ (10^8)	188 ± 27	308 ± 80	793 ± 50
ЭБ + поли-А:У (300 γ)	$569 \pm 7,4 (3,0)^a$	$3745 \pm 179 (10,2)^a$	$3223 \pm 435 (4,1)^a$
Без обработки	5 ± 2	$10 \pm 0,1$	138 ± 4

^a Отношение стимулированные/нестимулированные 5 животных в группе.

Прежде чем обратиться к аналогичному эффекту в системе *in vitro*, я хочу подчеркнуть, что в табл. 70 степень ответов на бараньи эритроциты указана в определенном порядке: самые слабые ответы у С57, более высокие у DBA и самые сильные у CBA.

ТАБЛИЦА 71

Эффекты поли-А:У на ответы антител к ЭБ *in vitro* (среда ЕНАА)

Добавлены к культурам	БОК/10 ⁶ клеток селезенки, 4 дня после начала культивирования с клетками		
	С57BL	DBA	CBA
ЭБ	319	166	63
ЭБ + поли-А:У (10γ) ^a	342 (1,1) ^b	370 (2,2)	117 (1,9)
ЭБ + поли-А:У (1γ)	375 (1,2)	167	122 (2,0)
ЭБ + поли-А:У (0,1γ)	350 (1,1)	162	64
—	11	7	12

^a Клетки были преникубированы в течение 10 мин и отмыты перед культивированием.

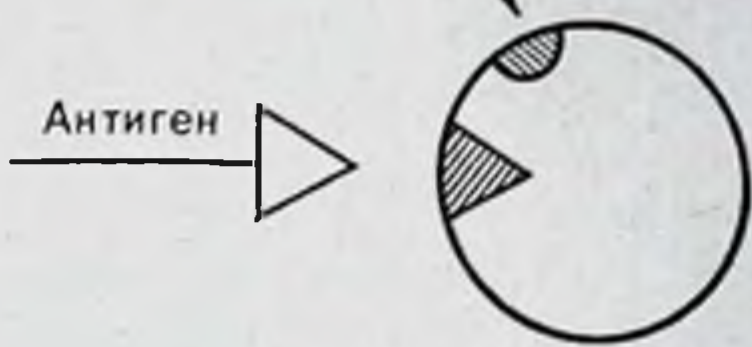
^b Цифры в скобках показывают отношение стимулированных/нестимулированных, в культурах которых ответ был выше, чем в культурах не экспонированных с поли-А:У. Все цифры средние по результатам трех культур.

В табл. 71 показаны ответы на бараньи эритроциты в системе *in vitro* с новой средой, предложенной Click, Benck и Alter, которая содержит меркаптоэтанол и не нуждается во встряхивании и ежедневном подкармливании культур. Следует отметить, что порядок силы ответов на этот антиген является обратным порядку *in vivo*, это уже указывает на наличие вспомогательных, зависимых от линии, факторов *in vivo*. Мы видим, что обработка селезеночных клеток поли-А:У до приготовления культур удваивает ответ у мышей DBA и CBA, но почти не усиливает ответ у С57.

Сейчас у нас много доказательств того, что поли-А:У, как и многие другие адьюванты, действуют на уровень циклического АМФ в В-клетках. На самой первой из этих иммунологических конференций в Brook Lodge несколько лет назад Sohn предсказал, что для того чтобы начать заметную активацию В-клеток, необходимы отдельные сигналы для соответствующих В-клеток. Как видно из рис. 47, экспериментальные данные теперь доказывают, что активация В-клеток действительно требует двух стимулов: специфического антигенного стимула и второго сигнала для активации системы усиления, зависимой от циклического АМФ. Каждый из этих стимулов в отдельности не вызывает заметной активации, но оба стимула обеспечивают полную активацию. В новейших исследованиях, проведенных, например, Katz и Benacerraf, Kreth и Williamson и в наших собственных исследованиях вместе с Matsumoto, было установлено, что кооперация Т- и В-клеток в образовании антител возможно представляет собой естественный процесс активации системы усиления, зависимой от циклической АМФ. Этот вывод поддерживается данными, приведенными на рис. 48; как *in vivo*, так и *in vitro*, если нет достаточного количества Т-клеток, например после тимэктомии или обработки анти-θ сывороткой + комплемент, обычную потребность в Т-клетках для ответов на антигены, зависимых от Т-клеток, можно удовлетворить, используя аллогенные нормальные селезеночные клетки или поли-А:У. Любой заменитель эффективно «включает» В-клетки. Теперь

Рецепторный участок
для зависящей от цАМФ
системы усиления

Антиген



—D: Отсутствие активации
—▷: Частичная активация
—▷ + —D: Полная активация

Рис. 47. Предполагаемые этапы включения определенных функций В-клеток.

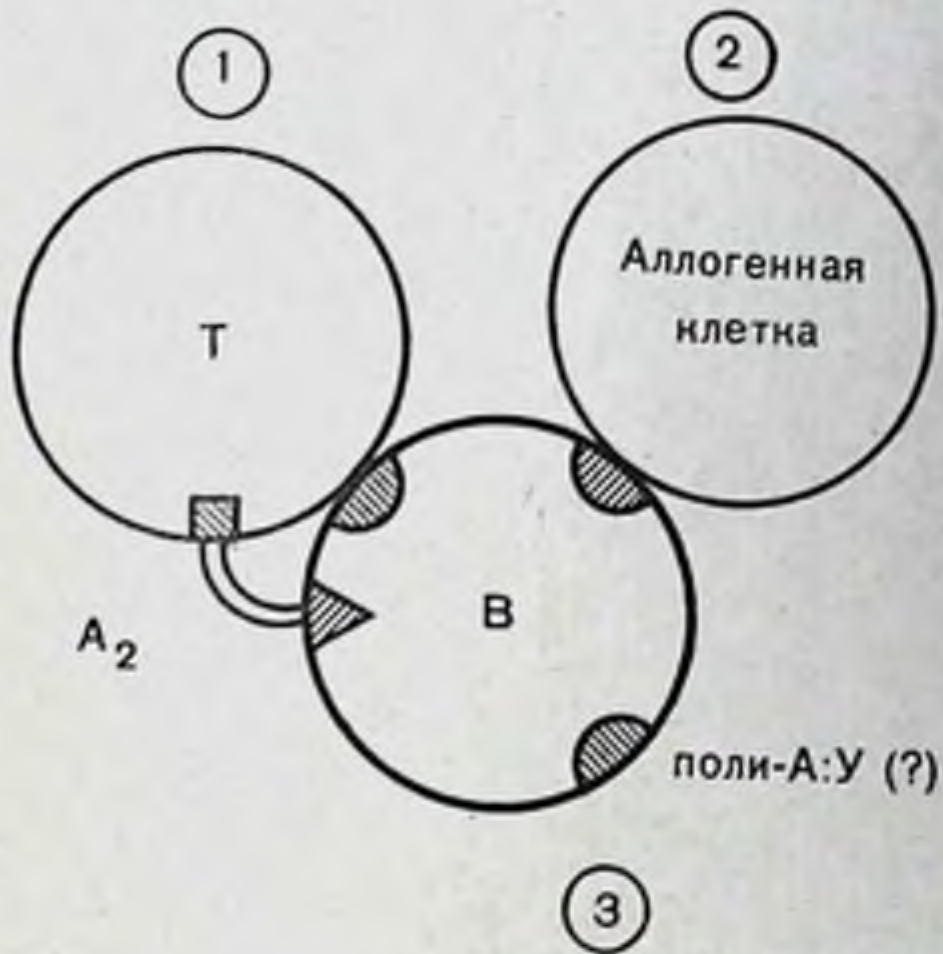


Рис. 48. Три возможных механизма активации, зависящей от цАМФ системы усиления В-клеток, инкубированных с антигеном.

мы знаем, что эти два заменителя действуют посредством повышения уровня циклического АМФ, это было доказано при помощи непосредственных измерений. Эта видимая зависимость усиления от системы циклического АМФ ставит перед нами вопрос о том, не связаны ли различия между линиями по общей иммунореактивности с различиями по динамике системы циклического АМФ. Как видно из рис. 48, имеющиеся данные позволяют думать, что это действительно так (Shiozawa, Braun — неопубликованные данные). Мы сравнивали активность аденилциклазы, т. е. фермента, ответственного за образование циклического АМФ из АТФ в популяциях селезеночных клеток С57 и СВА после контакта с ФГА, который, как известно, усиливает активность аденилциклазы (Winchurch и Braun «J. Immunol.», 1971, v. 106, p. 1399). Характер ответа весьма различен у мышей СВА и С57. В клетках СВА через 30 мин после контакта с ФГА уровень активности аденилциклазы все еще нарастает и последующие тесты показывают, что эта активность достигает вершины через 60 мин. Напротив, в клетках С57 наблюдается быстрое раннее повышение, заметное через одну минуту после контакта с ФГА, и активность аденилциклазы достигает максимума через 10 мин, а затем снижается. Следует заметить, что это является функцией фермента, связанного с мембраной и, следовательно, различия между линиями по динамике системы циклического АМФ возможно отражают различия по составу мембран двух линий. Результаты, приведенные на рис. 49, были получены при повторении опытов; на их основании можно предполагать, что, обсуждая генетический контроль иммунного ответа, необходимо учитывать генетические различия ответов животных на неспецифические факторы, изменяющие иммунный ответ. В упомянутых мной примерах таким фактором был регуляторный эффект системы циклического АМФ.

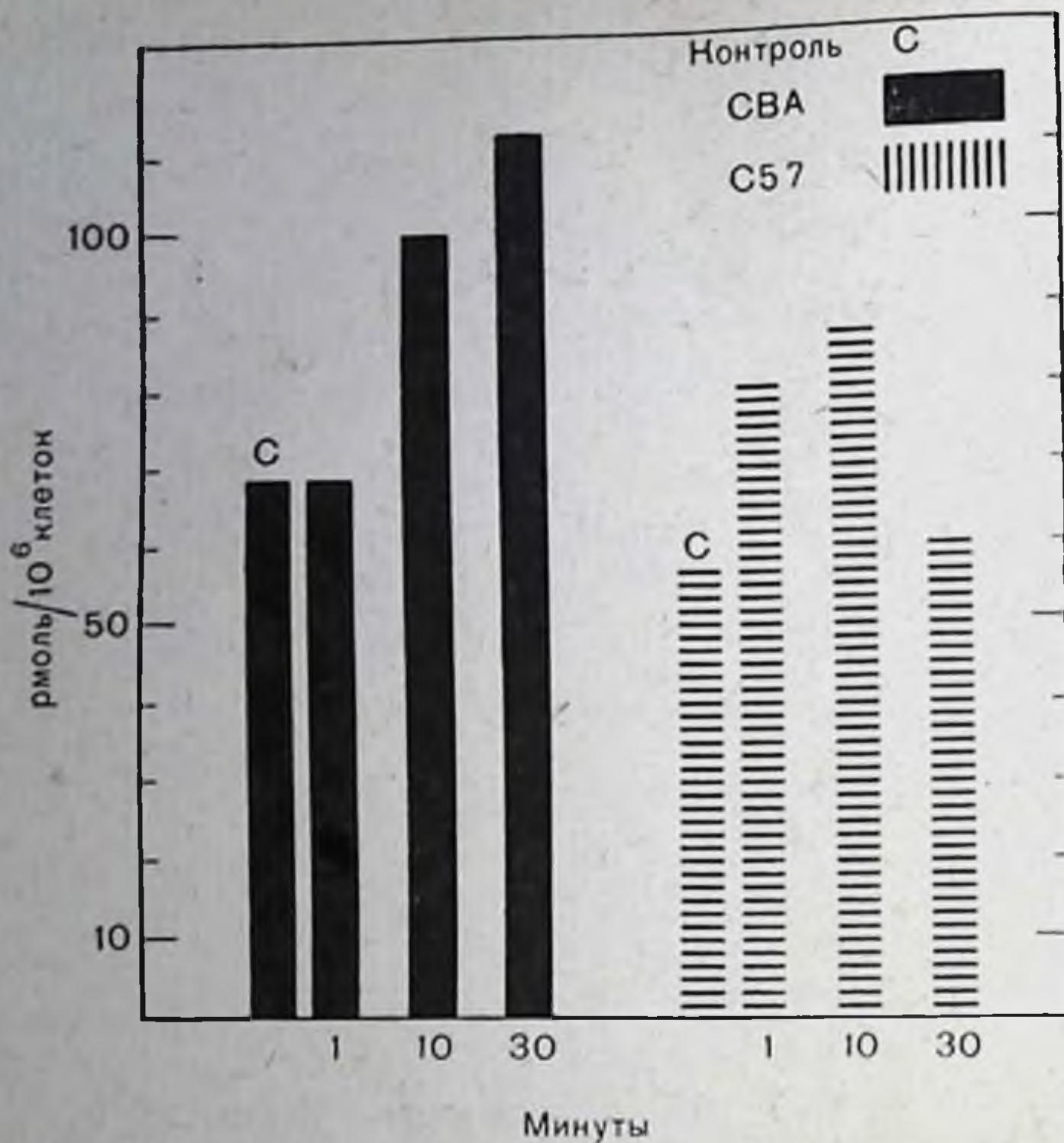


Рис. 49. Изменение эндогенного уровня цАМФ нормальных клеток селезенки мышей линий C57BL и CBA, инкубированных с ФГА. Уровень цАМФ определяется во взвеси клеток селезенки (2×10^7) с помощью метода Gilman ("Proc. Nat. Acad. Sci.", 1970, v. 67, p. 305).

Oldstone. Правильно ли я понял мысль Braun? Может ли он действительно специфически разделить все линии мышей на сильно и слабо отвечающие, исходя из предположения, что у них имеется различное количество рецепторов циклического АМФ или генетически контролируемые различия синтеза циклического АМФ? Я безусловно не согласен с Braun, что принципиально линия NZB обладает гиперреактивностью. Есть некоторые антигены, на которые они отвечают сильно, и другие антигены, на которые они отвечают слабо.

Braun. Конечно, было бы недостаточно разделять животных на основании присущих им различий в системе усиления на отвечающих сильно и слабо. В конце концов на этих трех сессиях мы обсуждаем генетические различия по ответу на специфические антигены. Мне кажется, надо помнить о возможности того, что взаимодействие антигена с рецептором в клетке может изменить также эндогенный уровень циклического АМФ, и мы знаем теперь, что избыточная стимуляция эндогенного циклического АМФ скорее подавляет, а не стимулирует функцию В-клеток. Следовательно, функция В-клеток может осуществляться слабо, либо при недостаточно сильном стимуле усиления, или же при избыточной стимуляции эндогенной системы циклического АМФ. Таким образом, как бы ни влиял первый стимул (взаимодействие антигена с рецептором) на эндогенную систему циклического АМФ, это отражается на последующем эффекте системы усиления; следовательно, характер антигена может повлиять на эффект системы усиления и обусловить сильный или слабый ответ при одинаковом усилении, опосредованном циклическим АМФ.

Cohn. Rajewsky задал очень важный вопрос и я хочу вернуться к нему, так как считаю, что мы обсуждаем сейчас неспецифические эффекты поли-А:У. Мы говорили об ответе на (Ф, Г)-Про-Л. Как предполагается этот ответ контролируется двумя генами: Ig-1 и Ig-3. Здесь говорилось, что поли-

A:У может сместить или усилить этот ответ. Хотелось бы знать, специфично ли это влияние для детерминант? Усиливает ли он ответ на (Ф, Г) и ставили ли Sheager или Sela реципрокный контроль у мышей SJL.

Sheager. Вопрос, заданный Cohn, действительно важен. Для первоначальных опытов и для опытов, которые были детально проанализированы, применялся (Т, Г)-Про--Л. Мы пытались усилить слабый ответ мышей SJL на специфический иммуногенный участок (Ф, Г)-Про--Л, пользуясь поли-А:У, но эта попытка оказалась безуспешной, как и попытки усилить ответ на (Ф, Г), сцепленный с Iг-1 и H-2.

Braun. Отсутствие ответа на поли-А:У можно объяснить различными предположениями. Это может означать, что отсутствуют необходимые клетки и стимулятор не может ничего сделать. Однако тот факт, о котором я упоминал раньше, подсказывает и другое предположение: функция В-клеток может быть слабой при избыточной стимуляции системы усиления. Конечно, в этих условиях дальнейшая стимуляция ничего не изменит. Если справедливо последнее предположение, то было бы интересно установить, может ли кинетинрибозид восстановить сильный ответ у слабо отвечающих животных, которые не отвечают на поли-А:У.

Sela. Какой бы из антигенов ни применять, ясно, что поли-А:У и клетки перитонеального экссудата не влияют на ответ, обусловленный Iг-1, но полностью восстанавливают ответ Iг-3.

Cohn. Это только трактовка данных. Я хотел бы знать сами данные.

Sela. Данные заключаются в том, что поли-А:У и клетки перитонеального экссудата полностью восстанавливают ответ на полипролин в (Т, Г)-Про--Л и в (Ф, Г)-Про--Л, но не влияют на слабый ответ к Т, Г после иммунизации (Т, Г)-Про--Л и слабый ответ на (Ф, Г) в (Ф, Г)-Про--Л. Если мы пытаемся усилить слабый ответ на (Ф, Г) в (Ф, Г)-Про--Л, то наши попытки безуспешны, но если взять линию, которая слабо отвечает на Про--Л, то независимо от того, введем ли мы (Т, Г)-Про--Л или (Ф, Г)-Про--Л, мы достигнем полного восстановления и получим сильный ответ.

Cohn. Получаете ли вы сильный ответ на (Ф, Г) и Про--Л? У той линии, которой вы вводите (Ф, Г)-Про--Л и поли-А:У вы получаете ответ только на поли-Про--Л, а не на (Ф, Г)?

Sela. Да, это верно.

Sheagere. Мы не получаем дальнейшего усиления ответа на Ф, Г, так как линия, которая слабо отвечает на Про--Л, генетически является линией, сильно отвечающей на (Ф, Г).

Cohn. Именно так я и думал.

Sheager. Эффект поли-А:У наблюдается только для специфичности, контролируемой геном Iг-3. Если перейти к иммуногенным макромолекулам таким, как (Ф, Г)-А--Л или (Т, Г)-А--Л, которые связаны с системой Iг-1, сцепленной с H-2, то мы не можем усилить слабый ответ.

Председатель Wagner. Теперь Merchant приведет данные особого рода, так как они относятся к генетическому профилю «фоновой» реактивности у нестимулированных животных.

Merchant. Я хотел бы рассказать о некоторых интересных данных относительно В-клеток, полученных совместно с Inman и Cloflin. В основном это результат новых методических усовершенствований, что привело к расширению числа гаптенных детерминант, применяемых для методов гемолитических бляшек.

Мы применяли ряд из 14 различных гаптенных детерминант. Каждая из них была сопряжена на дистальном конце с одним или двумя разными трипептидами, N-ацетил-тирозил-глицилглицином или β-аланилглицилгли-

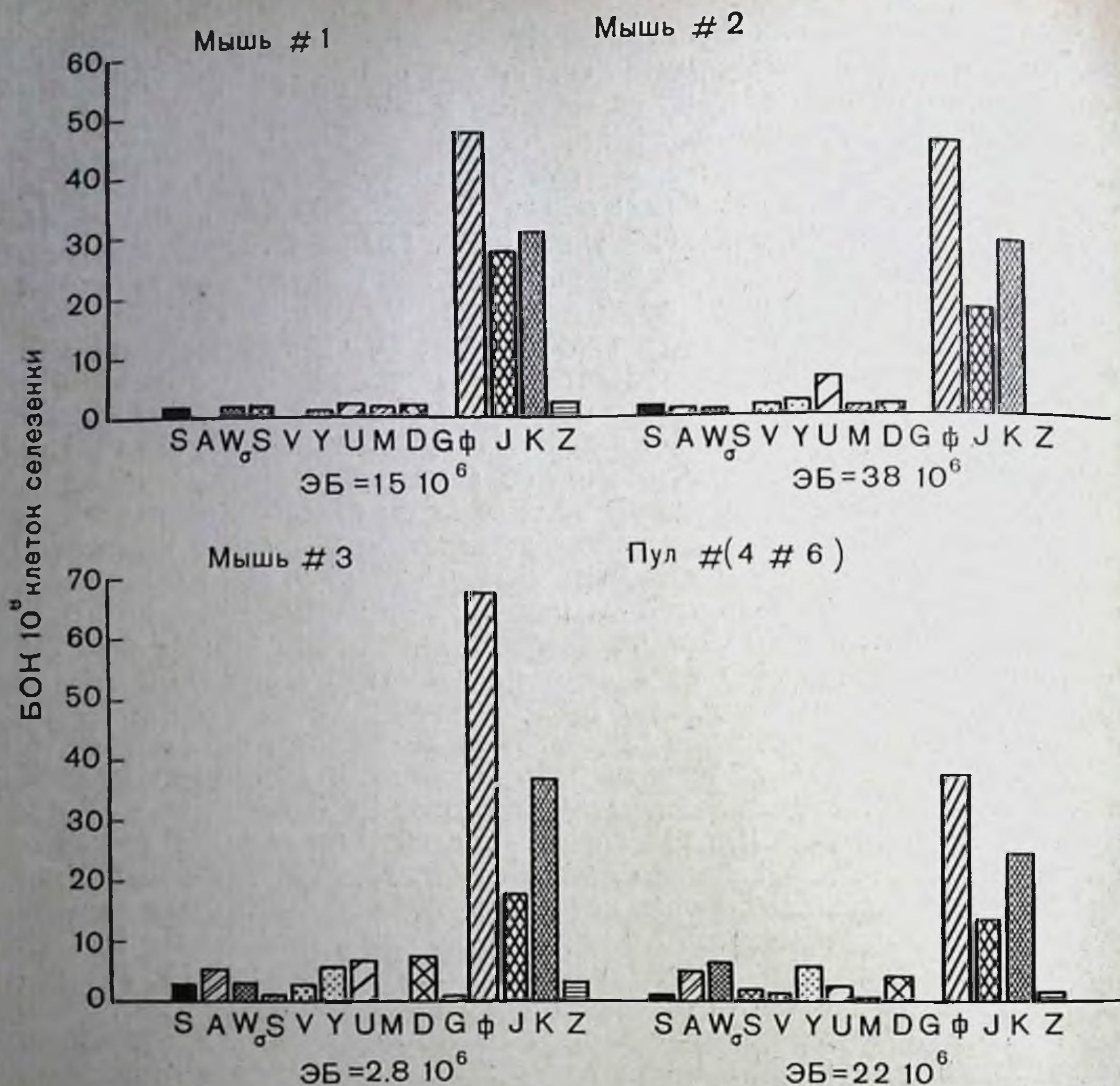


Рис. 50. Профили гаптентирозилглицилглицин гап-ТГГ IgM у необработанных безмикробных самцов BALB/c. Эксперименты были выполнены на животных в возрасте 7 нед.

цином: оба они сопрягаются почти исключительно с лизиновыми группами на эритроцитах. По существу, таким образом, мы имеем ряд из 14 различных гаптенных тетрапептидных детерминант. Гаптенные группы на дистальном конце таких увеличенных детерминант являются преимущественно азофенильными аналогами гаптена. Например, азобензол арсонат, азобензол сульфонат и азобензоат. В этот ряд вошли также производные ДНФ, ТНФ и дансильной группы, сопряженные с β -аланилглицилглициллизином. Мы применяли большие гаптены, размеры их примерно соответствовали вычисленным средним размерам активного центра антитела.

Основным побочным следствием применения таких больших гаптенных групп было то, что мы резко увеличили чувствительность методики гемолитических бляшек. По сравнению с иммунизацией малым гаптенем и пробой на бляшки с тем же малым гаптенем мы установили, что проба с той же суспензией иммунных клеток и соответствующим большим гаптенем обычно ведет к увеличению в 5—10 раз количества бляшкообразующих клеток. Таким образом, наша тест-система стала значительно более чувствительной. Это

повышенная чувствительность проявляется, например, также в том, что, пользуясь ДНФ тетрапептидным гаптенем нашего ряда, мы постоянно могли выявить 90% опухолевых клеток М315 в качестве бляшкообразующих клеток.

Мы иммунизировали инбредных животных одним из этих больших гаптенев, а затем испытывали клетки с каждым из 14 гаптенев. Полученные данные позволили нам построить 14-компонентный профиль гаптенев специфических бляшкообразующих клеток для каждой отдельной мыши. Сначала мы обнаружили заметное сходство «по профилям» бляшек между иммунизированными инбредными мышами.

Однако между животными одной и той же линии, пола и возраста, одинаково иммунизированными, но находящимися в разных помещениях, выявлены значительные различия, которые мы отнесли за счет различий внешней среды. Поэтому мы стали работать с мышами, живущими в стерильных условиях, и поскольку наша проба значительно более чувствительна, нам не приходилось иммунизировать этих мышей, мы просто у каждой мыши в отдельности исследовали естественную или врожденную «фоновую» активность бляшек IgM.

Пользуясь *pude* мышами (лишенными тимуса), без специфических патогенов и сравнивая их с нормальными гетерозиготными мышами того же помета, мы установили, что естественная фоновая активность бляшек у *pude* мышей

ТАБЛИЦА 72

Прогрессивное появление гаптен-реактивных БОК в собранной вместе лимфоидной ткани нормальных неиммунизированных зародышей мышей

Индикаторные эритроциты		БОК/10 ⁷ ядерных зародышевых клеток							зародыши мышей НИЗ ^a
		зародыши NZB			зародыши BALB/c				
		19	20	21	19	19	20	21	
Дни беременности		19	20	21	19	19	20	21	20
ЭБ (контрольные)	(P)	8	3	26	7	11	13	16	6
ЭБ с пара-азобензолсульфонат ТГГ	(S)						7		6
пара-азобензоларсонат ТГГ	(A)							6	2
мета-азобензолсульфонат ТГГ	(W)				1	1	1	1	2
орто-азобензолсульфонат ТГГ	(O)							10	
пара-бензолфенилазо ТГГ	(Y)			9					8
пара-азобензол ТГГ	(V)							26	2
пара-бромфенилазо ТГГ	(U)			6					
р-азофенилтриметил аммоний ТГГ	(M)			15			8	63	2
дансил-АГГ	(D)	2	2						
ТГГ	(G)								2
фенилазо-ТГГ	(Ф)		3	40			48	7	3
динитрофенил АГГ	(J)								
тринитрофенил АГГ	(K)		2	2					
бензилоксикарбонил АГГ	(Z)			13					

^a Национальный институт здравоохранения.

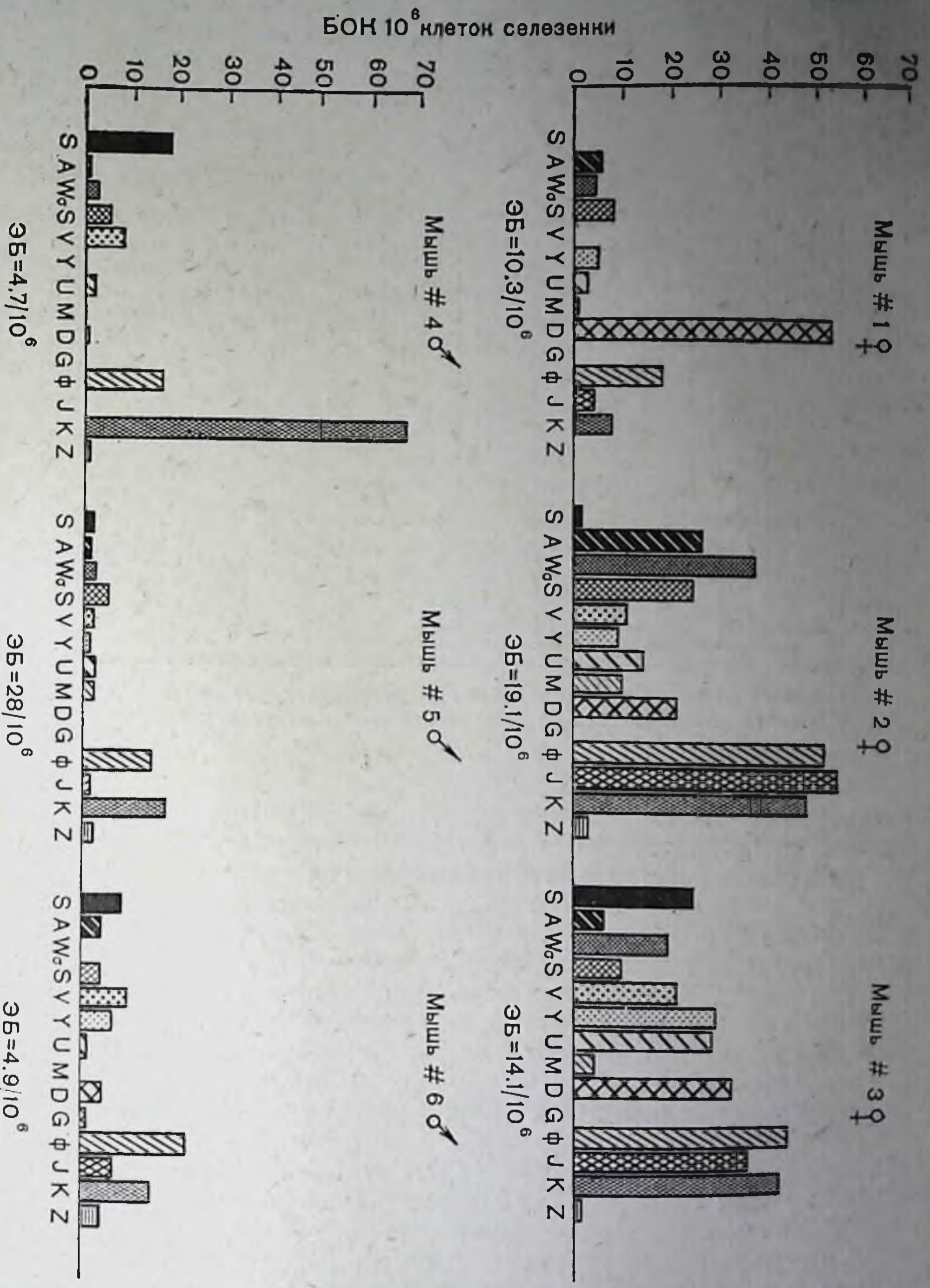


Рис. 51. Профили гап-ТТГ IgM у необработанных безмикробных беспородных мышей самцов и самок (NIN Swiss). Эксперимент выполнен на мышах 7-недельного возраста.

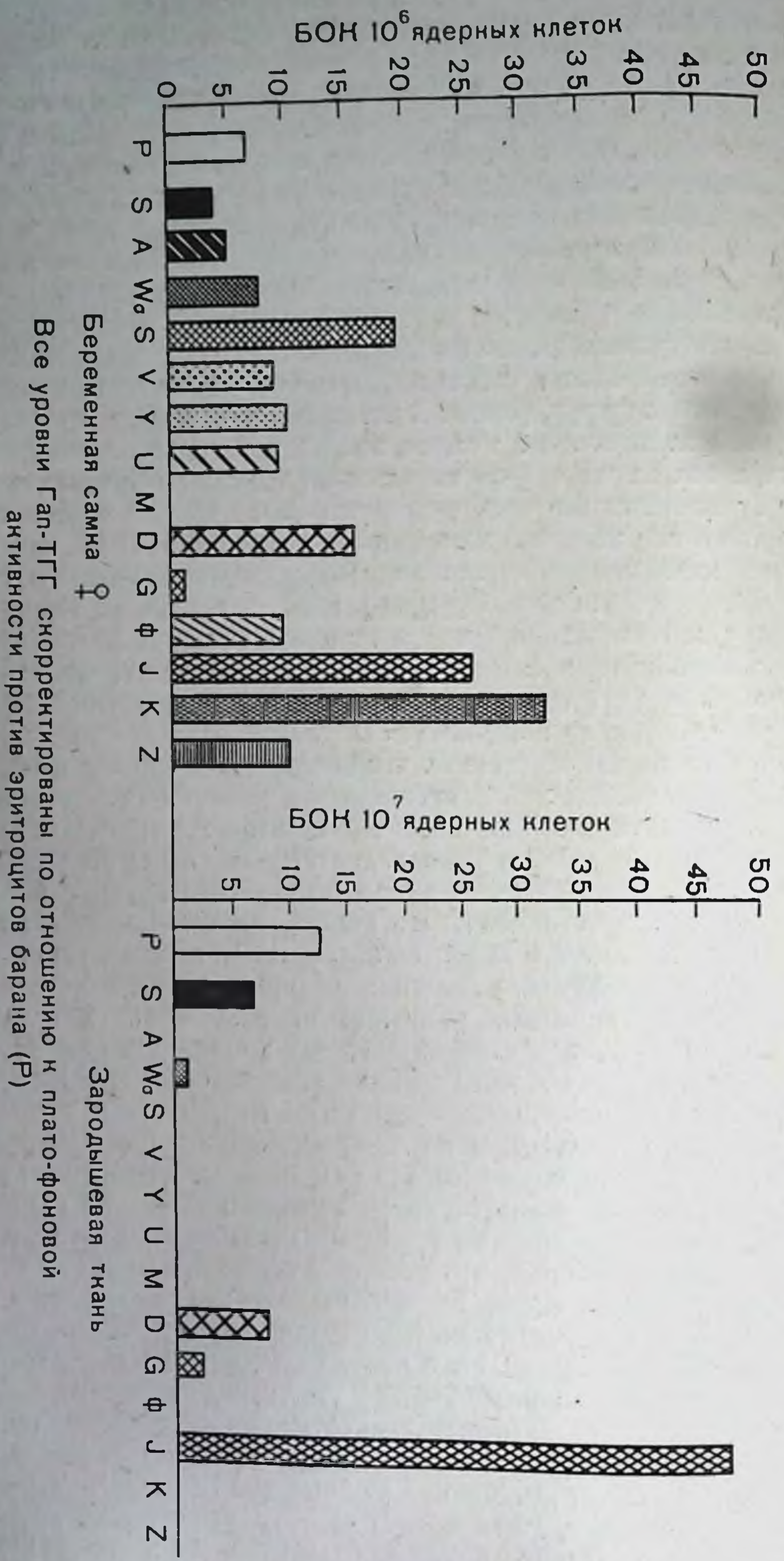


Рис. 52. Гап-ТТГ реактивные IgM БОК у нормальных беременных мышей ВАЛВ/с на 20-й день беременности и в лимф. фолликулярной ткани зародышей.

равна или больше, чем активность контрольных мышей по каждой из 14 гаптенных специфичностей. Таким образом, гаптеноспецифическая фоновая секреция IgM, очевидно, является феноменом, независимым от тимуса. На рис. 50 показан фоновый уровень гаптеноспецифических бляшкообразующих клеток для каждого из наших 14 гаптенных, у каждого из трех самцов BALB/c и суммарно для трех других мышей BALB/c. Можно видеть, что сходство по этим фоновым «профилям», специфическим к гаптенам, очень большое. Для обозначения отдельных гаптенных использован условный буквенный код. Этот код поясняется в табл. 72. Возможно, что такое сходство «профилей» обусловлено стимуляцией общими антигенами в рационе или в подстилке, с которыми имели контакт все эти стерильные мыши. Поэтому мы определили фоновый «профиль» у стерильных аутбредных Swiss мышей, получавших одну и ту же стерильную диету и находившихся на одной и той же подстилке. На рис. 51 выявлены глубокие различия по профилям между отдельными аутбредными мышами. Кроме того, абсолютное количество гаптеноспецифических фоновых бляшкообразующих клеток у стерильных мышей было всегда значительно выше, обычно в 2—5 раз выше, чем у обыкновенных мышей того же возраста, пола и линии. Таким образом, возникло предположение, что эта активность в действительности может быть спонтанной.

Приблизиться к среде, истинно лишенной антигенов, практически невозможно, поскольку нельзя вернуть животное в утробу матери. Поэтому мы пытались найти спонтанные секретирующие IgM клетки у неиммунизированных мышинных эмбрионов. Работая с мышинными эмбрионами, мы принимали много мер предосторожности, чтобы исключить возможность того, что определяемый нами эффект был обусловлен переносом через плаценту антигенов или материнских антител, или материнских клеток.

На рис. 52 показан уровень бляшкообразующих клеток у беременной самки BALB/c и в смешанных лимфоидных тканях всего помета эмбрионов этой же самки. Следует подчеркнуть, что важнейшая специфичность IgM у самки, специфичность α , т. е. активность против ТНФ-АГГ, не выявлялась в смешанных лимфоидных тканях плодов этой беременной самки. Таким образом, материнские антитела IgM или клетки, реактивные к ТНФ-АГГ, видимо, не влияли на активность к ТНФ-АГГ у ее плодов.

В табл. 73, приведены данные 7 опытов с плодами. Во-первых, мы хотим подчеркнуть, что мы никогда не видели никаких фоновых бляшкообразующих клеток в тканях плодов на 17-й или 18-й день беременности. Однако если мы отмечали какую-то специфичность на 19-й день, то мы постоянно находили эту же специфичность в других опытах с плодами той же линии в последующие дни. Таким образом, когда у мышей BALB/c или NZB возникала специфичность, она постоянно наблюдалась в последующих опытах, у более зрелых плодов, той же линии. Далее важно указать, что из 6 гаптенных специфичностей, найденных у плодов NZB на 21-й день (т. е. последний день беременности), только одна (т. е. специфичность к дансил АГГ) совпала с набором 6 специфичностей у эмбрионов мышей BALB/c на последний день беременности. Наконец, на предпоследний день беременности в группе аутбредных мышей обнаружено большее число специфичностей (8) и эти специфичности совпадали в значительной мере со специфичностями у каждой из двух инбредных линий.

В табл. 72 приведены контрольные данные к рис. 51, т. е. одновременно установленная специфичность клеток материнских селезенок в тех же семи опытах. При сопоставлении табл. 72 и рис. 51 мы видим, что большинство данных о бляшкообразующих клетках у матери и у плодов не коррелирует ни по величине, ни по специфичности. Таким образом, уровень

ТАБЛИЦА 73
Активности прямых гаптен-ТГГ БОК у беременных мышей

Тестируемые эритроциты		БОК/10 ⁶ клеток селезенки							НИЗ ♀♀
		NZB ♀♀			BaLB/c ♀♀				
		19	20	21	19	19	20	21	
Дни беременности									20
ЭБ контроли	(P)	8,2	15,9	18,5	3,4	35,5	7,1	5,5	4
ЭБ с пара-азобензолсульфонат ТГГ	(S)	0,4	22,2	0	0	31,7	4,4	2,8	0
пара-азобензоларсонат ТГГ	(A)	0	14,0	0	0	14,5	5,1	0	0
мета-азобензолсульфонат ТГГ	(W)	5,6	29,4	0	2,1	10,7	8,0	2,8	2,5
орто-азобензолсульфонат ТГГ	(O)	10	23,6	0	2,4	НТ	19,6	6,4	0
пара-азобензол ТГГ	(V)	4,5	11,6	8,8	3,8	24,0	9,1	3,6	3,1
пара-бензолфенилазо ТГГ	(Y)	9,3	11,3	0	2,4	26,0	10,0	4,0	4,0
пара-бромфенилазо ТГГ	(U)	3,3	21,7	0	1,8	35,5	9,6	0,2	0
пара-азофенилтриметил аммоний ТГГ	(M)	0	9,2	0	0	НТ	0	0	0
дансил АГГ	(D)	16,5	36,6	5,9	1,1	0	15,7	0	1,8
ТГГ	(G)	0	16,0	0	0	0	1,4	0	0
фенилазо-ТГГ	(Ф)	18,7	47,2	7,3	5,5	22,3	9,5	3,4	0,4
динитрофенил АГГ	(J)	44,9	113,2	33,7	9,8	47,4	26,4	7,9	18,1
тринитрофенил АГГ	(K)	35,6	118,1	53,7	12,9	23,6	32,2	4,5	17,0
бензилоксикарбонил АГГ	(Z)	0	18,0	0	0	0	10,1	1,1	0

IgM-бляшкообразующих клеток у матери не соответствовал уровню IgM-бляшкообразующих клеток плодов.

Я хочу подчеркнуть, что постоянно наблюдавшаяся корреляция в отдельных повторяемых опытах между некоторыми специфичностями IgM с некоторыми инбредными линиями взрослых мышей и мышинных эмбрионов указывает на генетический контроль. Отмеченные различия специфичности между мышами BALB/c и NZB могут отчасти объясняться различиями по регуляторным генам, однако, как я хочу подчеркнуть, мы изучали процесс, не зависящий от тимуса, и наши наблюдения были сделаны прямо на продуктах Ig, кодируемых структурными генами. Таким образом, у плодов двух разных линий инбредных мышей мы, видимо, обнаружили продукты структурных генов, кодирующих по крайней мере шесть различных, довольно тесно связанных иммуноглобулиновых специфичностей. Эти специфичности, очевидно, возникли прежде, чем иммунные системы плодов были подвергнуты каким-либо селекционным внешним влияниям. В появлении этих специфичностей совершенно не было признаков случайности, поэтому мы склонны объяснять их проявлением генов зародышевых клеток. Таким образом, если у инбредных эмбрионов постоянно встречаются проявления генов зародышевых клеток почти по половине (т. е. 6 из 14) из случайно отобранных синтетических тест-специфичностей, то можно предположить, что по существу имеется довольно большое количество генов V у зародышевых клеток.

Председатель Warner. У меня сложилось впечатление, что пока еще нет формальных доказательств существования какого-либо гена иммунного

ответа, не сцепленного с H-2 или с иммуноглобулиновым аллотипом. Правильно ли это? К тому же у нас нет и формальных доказательств, что существует какой-то ген иммунного ответа, действующий не в 7- или В-клетках. Есть ли у участников конференции замечания по этим вопросам?

Levine. Ваг и я изучали систему генетического контроля иммунного ответа, которая не коррелирует с H-2 и, видимо, не коррелирует с аллотипом. Это иммунный ответ мышей с синтезом реакинов.

Одна линия наших мышей хорошо исследована с многими антигенами, она вырабатывает большие количества антител IgG, но почти или совсем не вырабатывает реакинов. Мы сравнивали в своих опытах IgG₁ и реакины. У сильно отвечающей линии реакиновые титры равны 1:640, а у слабо отвечающей линии — 1:10 и меньше. Таким образом, разница довольно велика. Постоянной разницы по титру антител IgG₁ не отмечается.

Мы исследовали другую линию H-2^s мышей A.SW, хорошо образующих реакины. Кроме того, в наших экспериментах мы получили BC₁ с реципиентом SJL. Это потомство расщеплялось на мышей, хорошо образующих реакины, слабо образующих реакины (подобно двум родителям) и новую группу с промежуточным образованием реакинов. Найти корреляции с аллелем H-2 путем типирования клеток на «S»-антиген не удалось.

Эта система отличается от других систем, описанных ранее, тем, что она не специфична. Она может быть использована с различными антигенами (мы испытали около 8 или 9 антигенов) и, по-видимому, существует только для одного класса иммуноглобулинов — реакинов, т. е. иммуноглобулина IgG.

Председатель Вагнер. Есть ли у Levine какие-либо данные об аллотипе?

Levine. Пока мы тщательно изучили только линию SJL. Несколько других линий видимо также слабо образуют реакины, но мы испытали их только с тремя или четырьмя антигенами — это линии BUB, SWR и ST/b. Я полагаю, что они имеют разные аллотипы тяжелых цепей. Напротив, очень хорошо продуцируют реакины линии DBA/1, C57BL и A/He. Думаю, что эти линии представляют разные аллотипы.

Председатель Вагнер. Действительно, в группах линий, реагирующих и не реагирующих образованием реакинов, у Levine представлены разные аллотипы. Это видимо указывает на отсутствие связи этого иммунного ответа реакинового типа с аллотипом тяжелых цепей.

Rajewsky. Я хочу вернуться к замечанию председателя Вагнер, что пока ясно установлены только гены иммунного ответа, сцепленные с H-2 и сцепленные с аллотипом. Полагаю, что Ig-3 это ген иммунного ответа, не сцепленный ни с H-2, ни с аллотипом. Таким образом, Ig-3 является геном, влияющим на специфичность иммунного ответа В-клеток, хотя сам он не является рецептором антигенов.

Председатель Вагнер. Я думал, что Ig-3, возможно, служит примером, наиболее близким к этому определению. Однако о сцеплении его с аллотипом есть некоторые сомнения.

McDevitt. Отвечаю на возражения Сопп. В поставленных опытах получены ясные данные: сцепления с аллотипом не было. Если Сопп хочет установить, существуют ли множественные факторы, то надо поставить опыты на конгенных линиях. Это возражение было бы законным, однако наши данные показывают в той мере, в какой они вообще показательны, что иммунный ответ на (Т, Г)-Про-Л не сцеплен ни с аллотипом, ни с H-2.

Herzenberg. Следует упомянуть здесь еще один пример, опубликованный Gasser.

Schreffler. Лocus Iг-2 первоначально был обнаружен Gasser при скрещивании YBR и BALB/c. При этом скрещивании ответ на антиген Ea-1 был обусловлен одним генетическим фактором, сцепленным с Agouti, а также с H-3 и H-6 в пятой группе сцепления. При втором скрещивании между отвечающими мышами YBR и неответающими мышами C57BL, однако, получены данные, указывающие на два или более локусов. Дальнейший анализ выяснил, что один из двух генов связан с H-2, второй ген пока еще не идентифицирован. Не ясно, является ли этот второй ген Iг-2 в пятой группе сцепления или каким-то новым геном.

McDevitt. Согласно первоначальным данным Casseг, он, видимо, сцеплен с H-3 и с H-6. Затем Casseг скрестил других мышей и показал, что ответ на эритроцитарный антиген мышинных эритроцитов Ea-1, аналогичный системе АВ0 у человека, контролируется двумя генами. Один из них сцеплен с H-2, а другой — с H-3 и H-6. Таким образом, можно утверждать, что Iг-2 является тем или другим из этих локусов. Насколько мне известно, Casseг пока еще не определил его локализацию.

Председатель Warner. Было бы трудно подвести итоги этой интереснейшей напряженной сессии, однако я хотел бы сказать, что на этом этапе нашей дискуссии мы имеем по крайней мере два твердо доказанных типа генов иммунного ответа. Один тип, сцепленный с H-2, действует в Т-клетках и пока еще неизвестно, действует ли он также в В-клетках. На этой сессии приведено несколько примеров, доказывающих существование второго типа гена иммунного ответа, который действует в В-клетках и сцеплен с иммуноглобулиновым аллотипом, очевидно, он связан с V-генами. Различный характер антигенов, использованных для выявления генов для двух типов, их отличительные свойства и симметричность проявления гена одного типа в Т-клетках и гена другого типа в В-клетках — все это позволяет думать, что перед нами две совершенно обособленные, но дополняющие друг друга генетические системы.

Мне кажется, еще не решен вопрос о том, отражают ли другие примеры связи с аллотипом, например, со скоростью и количеством образования антител ту же иммунную систему, действующую через посредство V-генов. Возможно, существуют многие другие уровни контроля над общим синтезом антител. Наконец, нам представляется ясным, что существуют и другие типы генов иммунного ответа, возможно, проявляющиеся в макрофагах, хотя механизм их действия неизвестен.

Сессия 4

СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ГЕНАМИ ИММУННОГО ОТВЕТА, СЦЕПЛЕННЫМИ С ГИСТОСОВМЕСТИМОСТЬЮ, АЛЛОТИПОМ И АНТИГЕНОСПЕЦИФИЧЕСКИМИ РЕЦЕПТОРАМИ Т- И В-КЛЕТОК

Имуноглобулиновый состав рецепторов В-клеток. Невозможность обнаружить имуноглобулины на Т-клетках. Данные, говорящие о присутствии имуноглобулина на Т-клетках. Оценка противоречивых данных. Специфичность рецепторов на Т- и В-клетках. Блокирование функций Т-клеток антителами против антигенов тканевой совместимости и антителами против имуноглобулина. Отличительные особенности тимуснезависимых антигенов.

Упапе. Я хочу рассмотреть некоторую имеющуюся информацию о характере рецепторов для антигенов на Т- и В-лимфоцитах, так как за прошлые 5 лет этот вопрос широко изучался. Таким образом, я хочу отобрать лишь некоторые новейшие и важнейшие наблюдения, особенно остановившись на противоречивых и спорных вопросах, как, например, вопрос о наличии имуноглобулиновых рецепторов на Т-клетках.

Принято считать, что рецептор для антигена на В-клетке представляет собой молекулу антитела, что он локализуется на поверхностной мембране клетки и может взаимодействовать с антигеном и связывать его. В течение многих лет доказательств существования таких рецепторов на лимфоцитах были лишь косвенными и в основном были получены Gell и Sell, которые доказали, что кроличьи периферические лимфоциты в культуре превращаются в бласты при контакте с антителами к имуноглобулинам. Они пришли к выводу, что эта реакция была следствием образования иммунных комплексов с участием поверхностных имуноглобулиновых молекул. Лишь недавно Coombs и его сотрудники смогли обнаружить непосредственно такие имуноглобулиновые молекулы при помощи теста имуноцитоприлипания. Затем была опубликована волнующая работа Raff, Taylor и соавт., которые непосредственно увидели имуноглобулин путем имунофлюоресценции. Действительно, на всей поверхности живых лимфоцитов во взвеси, при инкубации с флюоресцирующими антителами против имуноглобулина появились маленькие обособленные пятна. При этом методе фоновой флюоресценции нет, и на клетке появляются многие малые обособленные пятна, которые легко распознать. На рис. 53 показан В-лимфоцит из селезенки мыши, окрашенный флюоресцирующими поливалентными антиимуноглобулиновыми антителами. Такая положительная реакция полностью снимается, если антиимуноглобулиновые антитела во флюоресцентном конъюгате будут специфически абсорбированы. Вместе с Perkins и Karnavsky мы продолжили эти исследования на ультраструктурном уровне. На рис. 54 показан В-лимфоцит после реакции с антителами к имуноглобулину, меченными ¹²⁵I. Зерна, представляющие молекулы поверхностного имуноглобулина, распределены вокруг плазматической мембраны клетки. Клет-

ка, несущая иммуноглобулин, представляет собой типичный малый лимфоцит селезенки.

Существует единое мнение, что молекулы иммуноглобулина на В-клетках действительно синтезируются этими клетками и не являются цитофильными антителами. Свободный мономерный γG не связывается с поверхностью лимфоцитов. А главное, можно отделить рецепторы с клетки при обработке трипсином, например, а затем поместить клетку в культуральную среду, лишенную мышинных белков, и наблюдать, как поверхностные иммуноглобулиновые молекулы появляются вновь. Преобладающий класс иммуноглобулинов на лимфоцитах различен у разных видов животных, а внутри вида зависит от возраста экспериментального животного и от условий внешней среды. В общем есть основания полагать, что в определенное время отдельные лимфоциты содержат на поверхностной мембране один класс иммуноглобулинов. Pernis установил, что у кроликов преобладает иммуноглобулин типа IgM. Мы в опытах с иммуофлюоресценцией установили, что около 50% лимфоцитов мышей несут IgM, а остальные—IgG и IgA. У человека около 30—50% периферических лимфоцитов, несущих иммуноглобулины, содержат IgM. У морских свинок преобладающие иммуноглобулины на поверхности лимфоцитов—это IgG.

Большинство лимфоцитов, на поверхности которых легко обнаружить иммуноглобулиновые молекулы, принадлежат к В-типу. В табл. 74 подведены итоги ряда наших опытов и работ других исследователей, на основании которых был сделан этот вывод. Например, у мышей, тимэктомированных во взрослом возрасте, летально облученных и затем восстановленных

ТАБЛИЦА 74

Доказательства происхождения лимфоцитов с легко обнаруживаемым поверхностным иммуноглобулином

1. У взрослых тимэктомированных мышей, летально облученных, с пересаженными сингенными костномозговыми клетками спустя 8—12 нед выявляются лимфоциты с поверхностным иммуноглобулином в количестве, сравнимом с таковыми у контрольных мышей, не тимэктомированных, но в других отношениях обработанных так же. Тимэктомированные мыши не имеют популяции лимфоцитов без обнаруживаемого поверхностного иммуноглобулина.
2. Голые (бестимусные) мыши имеют лимфоциты с поверхностным иммуноглобулином.
3. У птиц клетки фабрициевой сумки имеют выявляемый поверхностный иммуноглобулин; тимэктомия не истощает эту популяцию иммуноглобулинположительных лимфоцитов.

ТАБЛИЦА 75

Происхождение лимфоцитов без легко обнаруживаемого поверхностного иммуноглобулина

1. Тимоциты мышей F_1 , пересаженные взрослым тимэктомированным родителям (летально облученным и восстановленным сингенными клетками костного мозга), не демонстрируют обнаруживаемого поверхностного иммуноглобулина в периферических лимфоидных органах спустя 6 недель.
2. Большинство тимоцитов, сенсibilизированных или «обученных» антигеном, не имеют обнаруживаемого поверхностного иммуноглобулина.
3. У птиц бурсэктомия истощает популяцию иммуноглобулинположительных лимфоцитов.
4. Лимфоциты, имеющие θ -аллоантиген, не имеют обнаруживаемого поверхностного иммуноглобулина.



Рис. 53. [Микрофотография флуоресцирующего жизнеспособного лимфоцита из селезенки после инкубации с флуоресцирующей антииммуноглобулиновой антисывороткой. Положительная реакция в виде кольца. Около 50% клеток селезенки, представляющих собой популяцию В-клеток, содержит иммуноглобулины.

костномозговыми клетками, имеется такое же количество лимфоцитов с поверхностным иммуноглобулином, как у контрольных нетимэктомированных мышей. У неонатально тимэктомированных мышей, а также у голых (nude) мышей с врожденной аплазией тимуса имеется нормальное количество лимфоцитов с поверхностным иммуноглобулином. С другой стороны, у мышей, лишенных тимуса, нет популяции лимфоцитов, на поверхности которых не определяются молекулы иммуноглобулина. Далее Raff установил, что клетки, несущие θ -изоантиген, не имеют поверхностного иммуноглобулина, который можно было бы определить при помощи иммунофлуоресценции (табл. 75).

Сколько поверхностных молекул иммуноглобулинов имеется на поверхностной мембране В-лимфоцитов? Это количество было изучено с Greu при помощи теста ингибации, впервые описанного Faag и соавт. Взвесь живых лимфоцитов инкубируется с небольшим количеством антител против иммуноглобулинов. В дальнейшем эти антииммуноглобулиновые антитела инкубируются с иммуноглобулином, меченным ^{125}I , в количестве несколь-

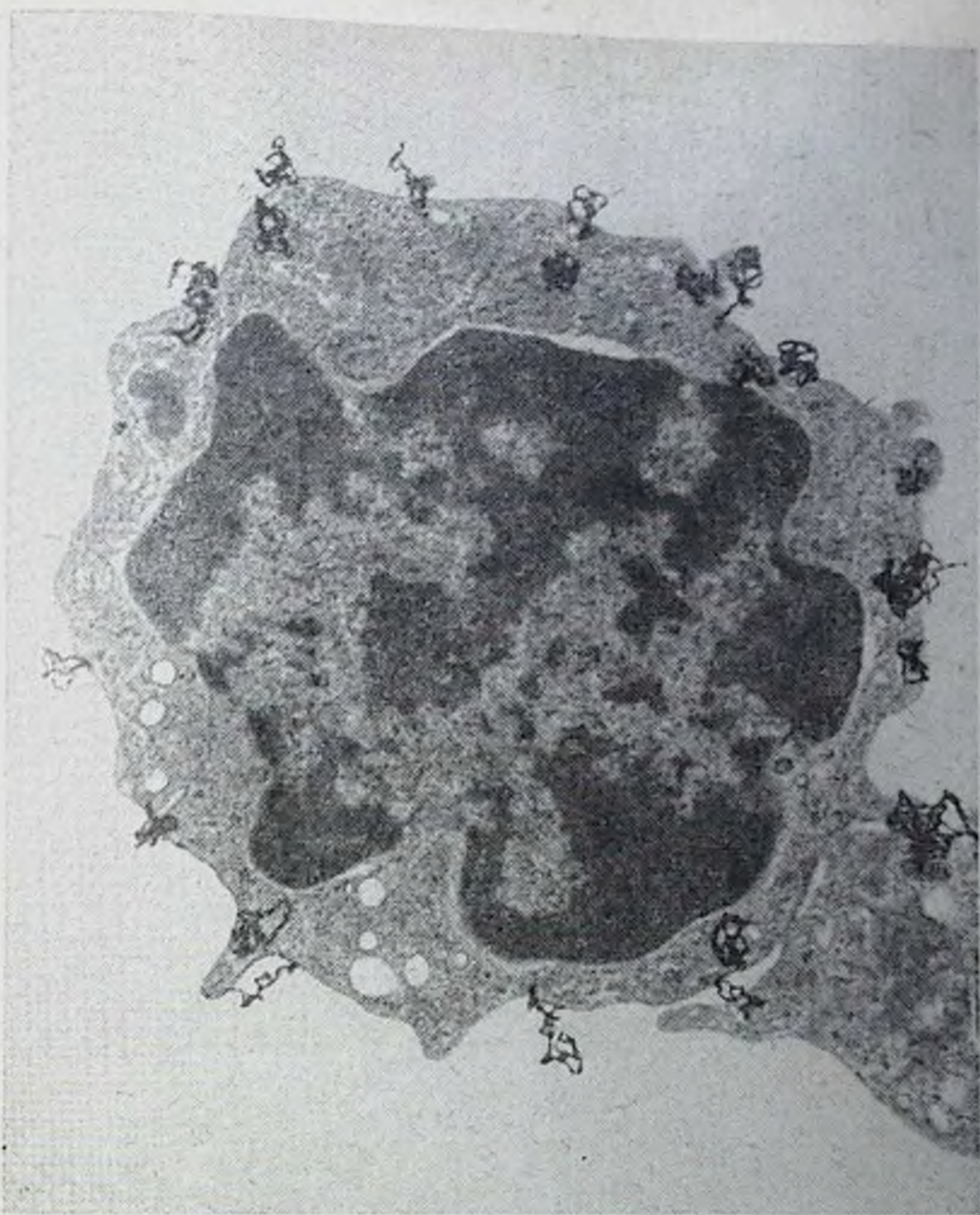


Рис. 54. Электронно-микроскопическая ауторадиограмма лимфоцита селезенки мыши после реакции с ^{125}I антииммуноглобулиновыми антителами при 4°C . При этой температуре иммуноглобулиновые молекулы распределяются по всей поверхности клетки ("J. exp. Med.", 1972, v. 135, p. 267).

ких микрограммов. Количество имеющихся иммуноглобулиновых молекул вычисляется на основании той степени, в какой предварительная инкубация с лимфоцитами подавляет стандартную реакцию между антииммуноглобулиновыми антителами и иммуноглобулином, меченным ^{125}I . При помощи этого теста мы получили цифры около 50 000—150 000 молекул иммуноглобулина на каждый В-лимфоцит. В большинстве опытов среднее количество составляло 10^5 молекул на клетку. У всех 5 линий мышей, изученных нами, получены примерно постоянные цифры.

Как распределяются иммуноглобулиновые молекулы на поверхности В-клетки?

Кагповsky изучал распределение этих иммуноглобулиновых молекул, пользуясь методом замораживания и протравливания. Он применял антииммуноглобулиновые антитела, меченные ферритином и гемодинамином.

На рис. 54 показана поверхность В-лимфоцита после реакции с антииммуноглобулиновыми антителами, в комплексе с ферритином. Распреде-



Рис. 55. Замороженный, протравленный препарат В-лимфоцита из селезенки мыши после инкубации с меченым ферритином антииммуноглобулином. Иммуноглобулин представляет собой сеть из беспорядочно расположенных плотных гранул ("J. exp. Med.", 1972, v. 135, p. 207).

ние молекул ферритина на всей поверхности клетки носит случайный характер. Это исследование проводилось в тех условиях, в которых поверхностные иммуноглобулиновые молекулы перемещались очень мало, т. е. клетки инкубировались с антителами при 2—4° С. При использовании этого метода чрезвычайно важно контролировать температуру на протяжении всего опыта. Теперь мы можем обнаружить большую часть иммуноглобулина, который, согласно прежним подсчетам, присутствует на поверхностной мембране.

Абсорбция конъюгата ферритина с антииммуноглобулиновыми антителами с помощью иммуноглобулина полностью подавляет реакцию.

Имуноглобулиновые молекулы не фиксированы ригидно на мембране, их легко удалить после реакции с антигеном или с антителами к иммуноглобулину. Впервые очень интересное явление описали Taylor, Raff, Duffus и Petris, установившие, что после реакции с флюоресцирующими антииммуноглобулиновыми антителами поверхностные молекулы иммуноглобулина быстро движутся. Недавно мы провели ряд морфологических и биохимических исследований с помощью этой реакции при участии Кагновский и его соавторов. На лимфоцитах, инкубированных при 4° С с мечеными антииммуноглобулиновыми антителами, иммуноглобулиновые молекулы распределены в случайном порядке по всей клеточной поверхности, как показано на рис. 54 и 55. Однако, если после этих реакций лимфоциты инкубируются при 37° С, то комплекс антииммуноглобулиновых антител и иммуноглобулина очень быстро перемещается на один полюс клетки и образует так называемый колпачок. Рис. 56 представляет собой электронограмму, изображающую это явление ровно через минуту после нагревания клеток до 37° С. Спустя несколько минут большая часть комплекса иммуноглобулина с антииммуноглобулином, содержащегося в колпачке, быстро поглощается маленькими пузырьками и поступает внутрь клетки. Таким образом, примерно на 24 ч В-лимфоцит остается без иммуноглобулиновых рецепторов (рис. 57). Для образования одного большого комплекса в колпачке требуется достаточное количество антииммуноглобулиновых антител для поперечного сшивания всех поверхностных молекул и живая метаболически активная клетка. Мы полагаем, что поперечное сшивание стимулирует движение клетки, и в этом процессе комплекс смещается в один участок мембраны.

При других электронно-микроскопических исследованиях с антииммуноглобулиновыми молекулами, мечеными гемоцианином, выяснилось, что в области колпачка иммуноглобулиновые молекулы расположены несколькими слоями. Поэтому возникает предположение, что комплекс был вытянут из мембраны прежде, чем перешел внутрь клетки. Действительно, другие опыты позволяют предполагать, что иммуноглобулиновые молекулы довольно свободно связаны с плазматической мембраной: лимфоидные клетки инкубируются при 4° С флюоресцирующими антииммуноглобулиновыми антителами, потом промываются и инкубируются от 1 до 5 мин при 37° С, чтобы на одном полюсе клетки мог образоваться один агглютинат. Клетки охлаждают до 4° С и сильно взбалтывают смесь; в этих условиях можно заметить, что многие клетки быстро теряют антииммуноглобулиновый комплекс, который переходит в надосадочную жидкость культуры.

Какова судьба иммунных комплексов, образующихся на мембране В-лимфоцитов? Переходит ли весь комплекс внутрь клетки, и если да, то разрушается ли он в лимфоцитах? Engers и я изучали эту проблему с помощью антииммуноглобулиновых антител, меченных ¹²⁵I. В своих опытах мы наблюдали за судьбой кроличьих молекул IgG, меченных ¹²⁵I и активных

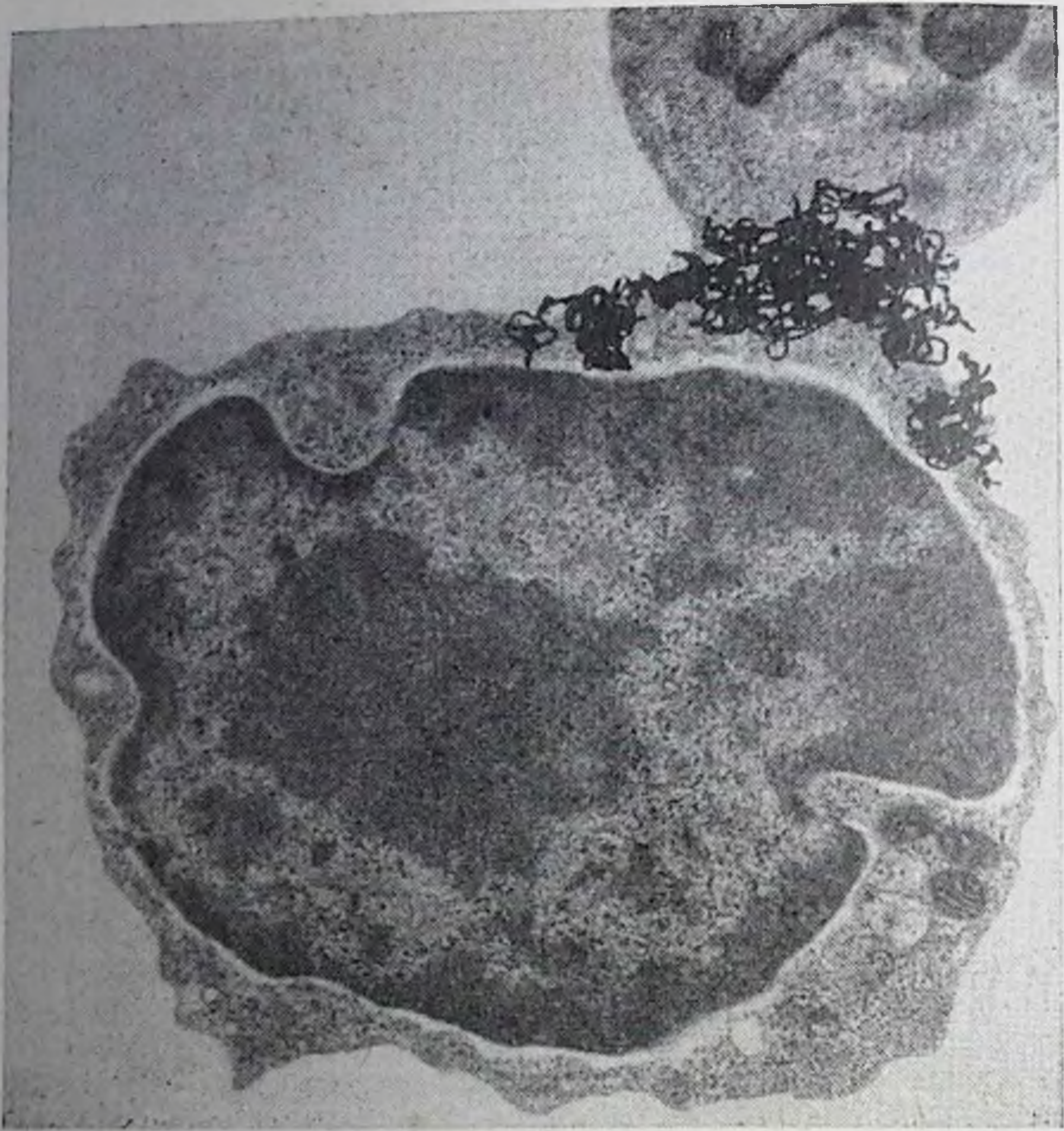


Рис. 56. Электронно-микроскопическая ауторадиограмма лимфоцита селезенки мыши после инкубации с ^{125}I антииммуноглобулином при 4°C и последующей инкубации при 37°C в течение 1 или 2 мин. Имеется агрегация меченых антител на одном полюсе клетки. Этот препарат из той же работы, что и рис. 53.

против мышинного иммуноглобулина, после образования иммунного комплекса на мембране В-лимфоцитов. По-видимому, судьба комплекса может быть двойкой. Например, около 10—20% меченых молекул отделяются от клетки в виде больших агрегатов, очевидно, иммунных комплексов антииммуноглобулина и иммуноглобулина. Это один вариант. При другом варианте молекулы частично перевариваются. Через 24 ч после начала культивирования 40—60% радиоактивности может присутствовать в надосадочной культуральной жидкости, главным образом в виде малых пептидов или низкомолекулярных белковых фрагментов. Остальные 40% еще присутствуют в клетке, но уже в виде низкомолекулярных белков. Таким образом, В-лимфоцит может разрушать поглощенные внутрь клетки иммунные комплексы. Эти два наблюдения, возможно, объясняют, почему несколько лет назад Nossal и Humphrey с соавт. не смогли обнаружить молекул антигена в плазмочитах, так как следует ожидать, что В-лимфоцит перерабатывает антигенные молекулы подобно кроличьему иммуноглобулину. Однако, по всей вероятности, различная степень поглощения и переваривания комплекса зависит от физико-химического состояния антигенных молекул.

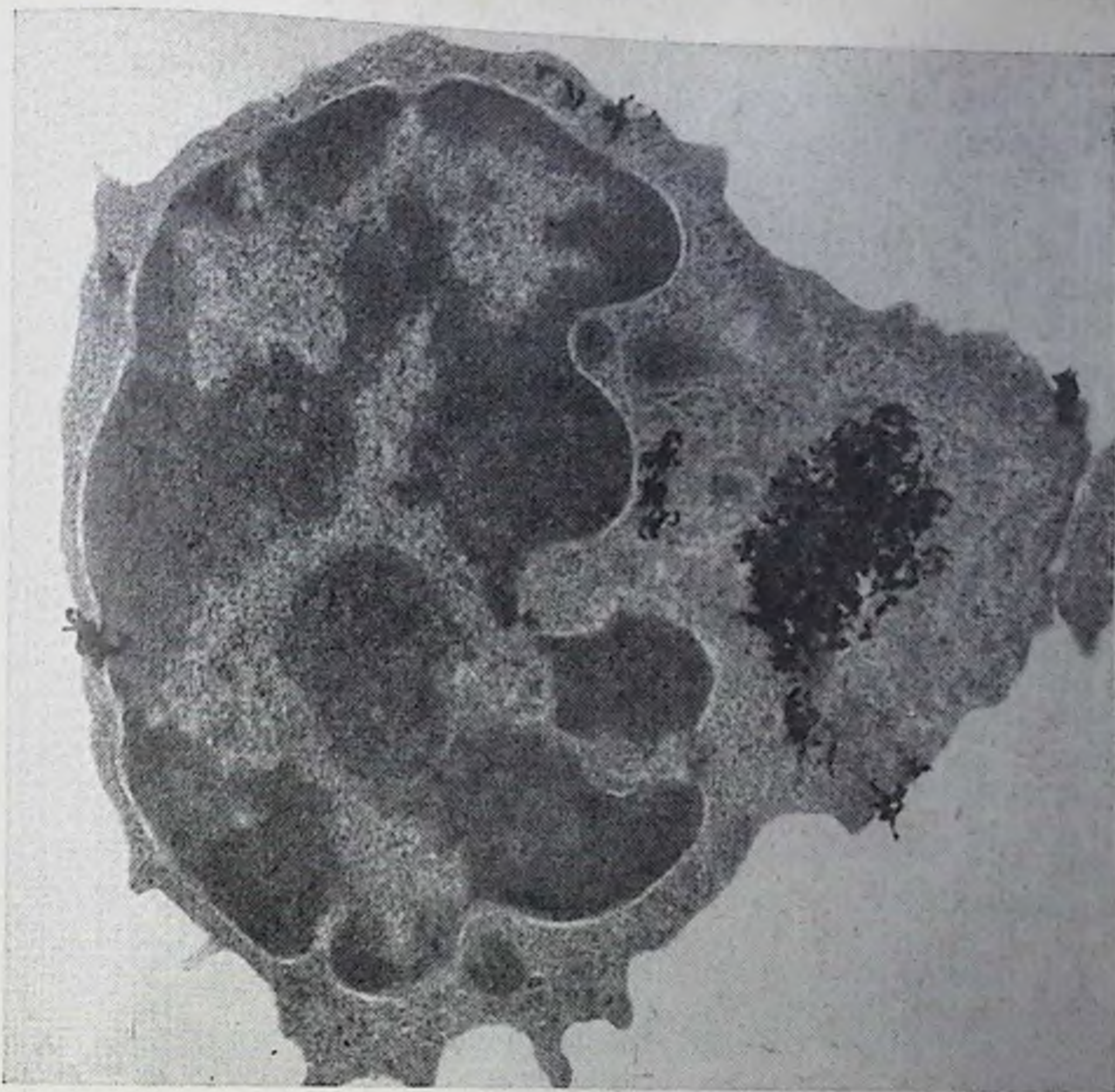


Рис. 57. То же исследование, что на рис. 53 и 56. Клетка инкубировалась 5 мин при 37°C. Меченые антитела находятся внутри лимфоцита.

Какова судьба В-лимфоцитов после поглощения комплекса внутрь клетки? Мы провели небольшое число опытов в этом направлении. Если лимфоциты, потерявшие иммуноглобулин мембраны вследствие образования комплекса с антииммуноглобулином, помещаются в культуральную среду, содержащую 10% сыворотки коровьих эмбрионов, то поверхностный иммуноглобулин снова появляется на них примерно через 24 ч. По-видимому, В-лимфоцит может ресинтезировать новые рецепторы после поглощения иммунного комплекса внутрь клетки.

Есть убедительные непрямые указания на то, что поверхностные иммуноглобулиновые молекулы В-лимфоцита используются для связывания антигена. Эти доказательства получены различными способами. Мы проводили ауторадиографию клеток, связывающих антиген, после контакта с радиоактивно меченым антигеном. При помощи этого метода можно подсчитать, что в селезенке очень небольшое количество лимфоцитов, примерно 1 на 10 000, может связывать молекулы антигена. Если до контакта с антигеном лимфоциты инкубируются с антииммуноглобулиновыми антителами, то наблюдается выраженное подавление связывания. Иммуноглобулиновые

рецепторы антигена на В-лимфоцитах, по-видимому, имеют ограниченную специфичность к антигену, как и следует ожидать согласно теориям клональной селекции. Наиболее убедительные доказательства этого рода получены в опытах с «самоубийством», когда обработка *in vitro* высокорadioактивным антигеном специфически снимает иммунный ответ к меченому антигену, но не снимает ответа на другие не родственные ему антигены. Вопрос о характере рецепторов В-клеток не вызывает особых споров. Антигенные рецепторы на В-лимфоцитах являются иммуноглобулиновыми молекулами, которые в случайном порядке распределены на мембране, имеют ограниченную специфичность и способны связывать антиген. Эти иммуноглобулиновые молекулы не плотно связаны с мембраной и их легко удалить при образовании комплекса с антигеном. Указанный процесс ведет к их «сбрасыванию» или поглощению внутрь клетки. Конечно, еще многое неизвестно о связях между движением поверхностных иммуноглобулиновых молекул после связывания антигена и активацией В-клеток.

Большие споры в клеточной иммунологии вызывает проблема антигенных рецепторов на Т-лимфоцитах. Многие авторы искали на них распознающий центр такого же типа, как рецепторы В-клеток для антигенных молекул, вместо того, чтобы попытаться обнаружить другой тип рецепторной молекулы, что безусловно было бы сложнее. Однако данные, которые имеются по вопросу о присутствии иммуноглобулина на Т-клетках, мягко говоря, противоречивы. Результаты функциональных анализов в отношении того, присутствуют ли поверхностные иммуноглобулиновые молекулы на Т-лимфоцитах, расходятся. При помощи прямых методик такого же рода, как для изучения В-лимфоцитов, не удалось ясно доказать присутствие такого рецептора иммуноглобулинового типа. Так обстоит дело с основной массой антииммуноглобулиновых антител, применявшихся большинством иммунологов. Следует отметить, что при помощи таких методик, как иммунофлюоресценция и ауторадиография, на мембране лимфоцита можно легко обнаружить около 10^3 молекул иммуноглобулина.

В чем же заключаются опыты, показавшие присутствие иммуноглобулина на лимфоцитах из тимуса? В этих опытах ряд иммунологических реакций подавлялся при инкубации Т-лимфоцитов с антителами против иммуноглобулинов. Так, при помощи таких методов удалось заблокировать РТПХ, реакцию в СКЛ, образование розеток Т-клетками и «самоубийство» (высокорadioактивным антигеном). В большинстве этих экспериментов поставлен хороший контроль и во многих из них присутствие естественных антител против клеточной мембраны видимо исключено. Однако есть два обстоятельства, которые вызывают недоумение. Во-первых, во многих из этих опытов необходимо было пользоваться строго отобранными антителами против иммуноглобулинов. Однако далеко еще не ясна специфичность, отличающая такие антисыворотки от антисывороток, которые не блокируют реакции Т-клеток. Во-вторых, многие другие исследователи не смогли воспроизвести эти данные, несмотря на использование довольно широкого диапазона антииммуноглобулиновых антител. Из-за этих противоречивых наблюдений вопрос о том, являются ли действительно антигенными рецепторами на Т-лимфоцитах иммуноглобулины, остается неясным. Мы можем вкратце рассказать о следующих опытах, поставленных нами.

Мы исследовали ряд антител против мышинных Fab-фрагментов иммуноглобулина, полученных у кур, кроликов и крыс при помощи иммунофлюоресценции или ауторадиографии (с короткими или длительными экспозициями). Пока с этими реагентами мы не выявили иммуноглобулиновых молекул на Т-клетках. Весьма убедительный опыт был поставлен Кагповsky с помо-

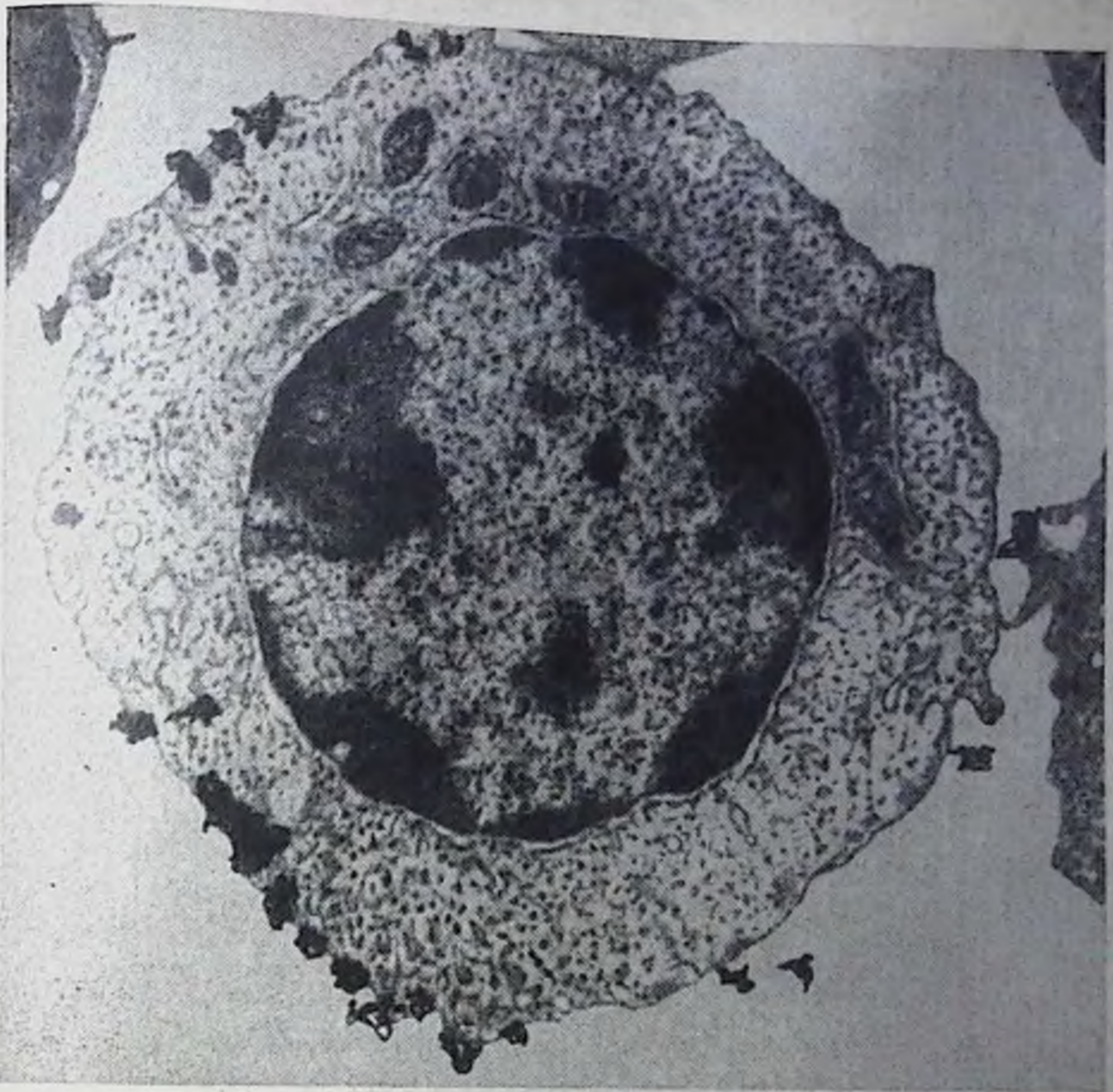


Рис. 58. Клетка тимуса, меченная ^{125}I антииммуноглобулином. Большинство меченых клеток имеет особую цитологию, отличающую их от большинства тимоцитов (и периферических лимфоцитов); в них обнаруживается большое количество цитоплазмы с меньшей плотностью рибосом ("J. exp. Med.", 1972, v. 135, p. 267).

щью замораживания и протравливания, когда можно ясно видеть большую часть поверхностной мембраны клетки. Этот метод не выявил никаких иммуноглобулинов на тимусных или периферических Т-клетках при контакте с антииммуноглобулиновыми антителами, в комплексе с ферритином. При помощи этого метода можно обнаружить большинство иммуноглобулиновых молекул на В-лимфоцитах. Интересно отметить (причем мы не можем дать этому явлению ясного объяснения), что в тимусе имеется очень небольшая, но постоянная популяция клеток, которые несут на поверхности иммуноглобулиновые молекулы. Количество их составляет обычно около 1 клетки на 300 тимоцитов. Лимфоциты, несущие поверхностные иммуноглобулиновые молекулы, обладают особыми цитологическими признаками, отличающими их от остальных тимоцитов, их цитоплазма менее плотная и содержит меньшее количество полирибосом (рис. 58).

Мы предполагаем, что многие из этих лимфоцитов, имеющих поверхностный иммуноглобулин, по существу являются В-лимфоцитами, которые осели в тимусе. В литературе есть указание на то, что лимфоциты в периферической крови могут проникнуть в тимус и осесть в нем. McCluskey и соавт. изучали распределение лимфоцитов лимфатических узлов, меченных *in situ*

^3H -тимидином, и установили, что небольшое количество этих лимфоцитов мигрирует в мозговой слой тимуса. Гистологи давно отмечали наличие плазматических клеток в тимусе. Плазматическая клетка образуется из В-лимфоцита, таким образом, следует предполагать, что в мозговом слое тимуса очевидно осело небольшое количество В-клеток. Мы исследовали вопрос о том, чувствительны ли иммуноглобулинположительные тимоциты к обработке анти- θ -сывороткой. Тимоциты инкубировали с анти- θ -сывороткой и комплементом, затем помещали в градиент Fiedl—Нураque, чтобы отделить живые клетки от мертвых. Обработка анти- θ -сывороткой убивала не менее 98% тимоцитов. Среди 1—2% выделенных живых клеток было около 50% макрофагов и 50% типичных лимфоцитов с поверхностным иммуноглобулином. Этот опыт означает, что лимфоциты с поверхностным иммуноглобулином, находящиеся в тимусе, являются либо В-клетками, либо Т-клетками с низкой плотностью θ -рецепторов. В общем, по-видимому, те методы, которые могут обнаружить несколько сотен молекул, не выявляют антигенных детерминант, распознаваемых большинством антител на большинстве периферических Т-клеток.

Сложной проблемой были также поиски клеток, связывающих антиген среди тимоцитов или периферических Т-клеток. Engers в нашей лаборатории провел ряд опытов в поисках клеток, способных связывать антиген высокого молекулярного веса гемоцианин, среди тимусных клеток. Для этого он применял, во-первых, ауторадиографию, причем клетки вначале инкубировались с антигеном, а затем с антителами, меченными ^{125}I . Клетки, связывающие антиген, исследовали ауторадиографически; во-вторых, он определял количественно антиген, связанный с лимфоцитами при помощи теста ингибиции Фагг (табл. 76). В селезенке антиген связывает около 0,1—

ТАБЛИЦА 76

Процедуры для выявления клеток, связывающих гемоцианин

Тест	а) 6 мкг ^{125}I гемоцианина реагируют с разведенной мышинной сывороткой против гемоцианина в количестве, достаточном, чтобы связать 30—50% антигена. б) Связанный гемоцианин измеряют копреципитацией комплекса с антимышиным иммуноглобулином.
Выведение кривой подавления	Немеченый гемоцианин реагирует с антисывороткой против гемоцианина до добавления ^{125}I -гемоцианина.
Подсчет клеток, связывающих гемоцианин	Лимфоидные клетки инкубируются обычно в концентрации $3—5 \times 10^7$ клеток с 100—500 мкг гемоцианина при 40°C ; отмываются, затем клетки используются в стандартном тесте, чтобы определить степень уменьшения связывания ^{125}I -гемоцианина под влиянием предшествующей инкубации мышинной сыворотки против гемоцианина с клетками. Степень подавления переводят в количество гемоцианина, связанного с клетками, с помощью стандартной кривой подавления.

«Feder. Proc.», 1972, v. 31, p. 735.

0,2% клеток. В тимусе количество клеток, связывающих антиген, примерно в 10 раз меньше, чем в селезенке. Связывание антигена с селезеночными клетками подавляется не менее чем на 85%, если клетки инкубируются с антителами против иммуноглобулина. Однако связывание антигена с Т-клетками подавлялась максимум на 35—50%. Этот последний результат имеет пограничную достоверность из-за очень низкого количества клеток,



Рис. 59. Результаты подсчета гемоцианина, связанного с клетками селезенки иммунных и неиммунных животных. На вертикальной оси дано количество свободного гемоцианина, использованного в реакции; степень ингибиции показана на горизонтальной оси. Данная кривая является нормальной кривой для гемоцианина.

связывающих антиген в тимусе, и ошибок, возможных при подсчете. Интересные результаты дали попытки количественно определить антигены, связанные с селезеночными и тимусными клетками (рис. 59). Так, мы получили цифру около 8000 молекул гемоцианина на одну селезеночную клетку из расчета на степень подавления связывания гемоцианина, меченного ^{125}I . Мы применяли комплекс антител против гемоцианина и исходили из допущения, что весь антиген, связанный с лимфоцитами, выявляется ауторадиографией. Популяция тимусных клеток также связывает антиген, но в 2 раза меньше, чем популяция селезеночных клеток. Вычислив количество связанных антигенных молекул на одну Т-клетку, мы получили цифры от 10 000 до 30 000 молекул. Мы исходим из допущения, что весь антиген связывается исключительно с теми клетками, которые выявляются при ауторадиографии. Может быть, в отношении тимуса это допущение не правомерно. В этих количественных опытах мы можем в основном подавить связывание с селезеночными лимфоцитами при инкубации с антителами против иммуноглобулинов. Однако, когда мы берем популяцию Т-клеток, такого подавления нет. Это предварительные результаты, нуждающиеся в проверке.

В общем я признаюсь, что мне совершенно не удалось обнаружить присутствие иммуноглобулиновых молекул на Т-клетках при помощи ряда функциональных анализов и прямых морфологических наблюдений. Как примирить эти отрицательные результаты, полученные многими, с немногочисленными положительными результатами, опубликованными в литературе? Задача эта довольно трудная, но, может быть, проблема стала бы яснее, если бы исследователи обменялись между собой реагентами и сравнили свои методики. Для решения этой проблемы требуются новые экспериментальные пути. Возможно, ответ даст изучение Ig-генов, сцепленных с H-2.

В заключение я предложил бы следующую рабочую гипотезу: антигенные рецепторы Т-клеток, которые по всей вероятности контролируются

генами, Ig-сцепленными с¹H-2, являются молекулами, которые серологически и функционально отличаются по своим свойствам от рецепторов антител на В-клетках. Серологически эти молекулы отличаются от молекул на В-клетках, так как они не реагируют или реагируют слабо с большинством использованных антииммуноглобулиновых антител. Т-клетка, видимо, имеет также иной диапазон специфичности к антигену, который известен из классических исследований ПЧЗТ и опытов с использованием комплекса гаптен—носитель. Я склоняюсь к мысли, что рецептор представляет собой более примитивную или более раннюю распознающую единицу, специфичность которой, быть может, менее ограничена, чем у классических иммуноглобулиновых молекул. Т-клетка считается очень важной для иммунного ответа, ей придают важную роль в защите против различных бактерий, вирусов и простейших и, вероятно, также в иммунном надзоре. Эта клетка обладает важной способностью регулировать функцию двух других линий клеток: В-клетка с весьма узкой специфичностью распознавания антигенов и макрофагов без специфичности распознавания, но обладающих способностью разрушать микроорганизмы. Можно допустить, что эта важная биологическая функция может осуществляться Т-клеткой, но имеющей систему распознавания менее узкой специфичности.

Председатель Razewsky. Мы выслушаем еще два выступления на эту тему. Тем не менее сейчас можно задать вопросы Унапие.

Sela. Может ли Унапие сказать нам, что происходит, когда он ставит тесты на связывание антигена с совершенно посторонними клетками, например эритроцитами или печеночными клетками? Ведь при этом некоторые клетки очевидно связывают гемоцианин и это связывание не подавляется антииммуноглобулиновыми антителами.

Унапие. Возможно. Клетки тимуса, связывающие антиген, выглядят как типичные малые лимфоциты. Однако я не ставил тестов связывания с эритроцитами и печеночными клетками.

Nisonoff. На рис. 47 показано, что популяция тимусных клеток содержит В-клетки. Это верно?

Унапие. Я думаю, что это действительно В-клетки.

Nisonoff. Разве нельзя допустить, что в тимусе имеется некоторое количество В-клеток, связывающих гемоцианин?

Унапие. Это правильное замечание. Количество В-клеток в тимусе должно составлять около 10% для того, чтобы объяснить результаты, полученные при связывании антигена. Это количество представляется слишком высоким. Поэтому мы приходим к выводу, что тимусные клетки, связывающие антиген, являются истинными тимусными клетками.

Nisonoff. Еще один вопрос. Вызвал ли кто-нибудь «самоубийство» хелперных клеток, пользуясь радиоактивными белком?

Унапие. Miller и его сотрудники в Австралии с успехом осуществили такую попытку.

Nisonoff. Подавлялось ли это «самоубийство» антителами против IdG?

Унапие. Да.

Nisonoff. Как же Унапие объясняет опыты Miller?

Унапие. Это один из спорных вопросов, почему некоторые отобранные реагенты против IgG эффективны, а другие нет.

Uhr. Я хочу сделать два замечания в связи с опытами Унапие. Во-первых, полагаю, что опыты со связыванием антигена весьма интересны. Пользуясь поливалентностью антигена, он разработал другой, новый подход к вопросу об антигеноспецифических рецепторах Т-клеток. Поскольку, по его данным, рецепторы не являются иммуноглобулином, очень важно

доказать специфичность связывания. Таким образом, требуется два контроля: исследование других популяций клеток, которые, очевидно, не имеют рецепторов, и других белков, сходных биохимически со специфическим белком, но не вступающих в перекрестную реакцию. Во-вторых, было бы интересно, как влияет предварительная обработка конгенной анти- θ -сывороткой и комплементом на связывание антигена взвесями тимусных клеток? Хотелось бы количественно определить роль при связывании клеток, не несущих θ ?

Упапе. Я согласен с Uhr. Именно такие опыты мы недавно начали. Необходимо продолжить их. Я хочу испытать несколько других антигенов. С точки зрения специфичности мы подумали о том, чтобы вводить антигены в таких условиях, когда мы можем придать толерантность популяции тимусных клеток, затем мы могли бы попытаться установить, присутствуют ли специфические Т-клетки, связывающие антиген.

Wilson. Упапе полагает, что некоторые клетки тимуса могут быть плазматическими клетками, а следовательно, происходят от В-клеток. Они связывают антиген и не блокируются антииммуноглобулиновыми антителами.

Упапе. Я полагаю, что это В-клетки.

Wilson. Разве нельзя допустить, что эти клетки в конце концов все же связывают антигены и тем не менее не блокируются антителами против IgG? Доказано ли, что плазматические клетки могут блокироваться антителами к IgG?

Упапе. Я не говорил, что клетки, связывающие антиген в тимусе, являются В-клетками. Я говорил лишь, что некоторые клетки тимуса, несущие поверхностный иммуноглобулин, могут быть В-клетками или Т-клетками с низкой плотностью θ -рецепторов, так как их не убивает анти- θ -сыворотка. Гипотезу о том, что они являются В-клетками, поддерживает наличие некоторого количества плазматических клеток в тимусе.

Wilson. Согласен. Было сказано, что тимусные клетки, связывающие антиген, не могут блокироваться антителами против иммуноглобулина.

Упапе. Клетки тимуса, связывающие антиген, не блокировались в значительной степени нашими антителами против иммуноглобулина.

McDevitt. Какой результат получил Упапе при попытке вызвать подавление антителами к Н-2?

Serpellini. Такой опыт был бы очень важным.

Упапе. Мы поставили только один опыт и не смогли подавить связывание.

Benacerraf. Может ли Упапе показать нам на рисунке распределение Н-2 на Т-клетках, так как это имело бы прямое отношение к нашей дискуссии. Мы тогда увидели бы, где находятся эти рецепторы.

Упапе. Рис. 60, о котором говорит Benacerraf, получен в результате замораживания и протравливания с обработкой тимусных клеток антителами против Н-2. Опыт поставлен вместе с Karnovsky. Ясно, что продукты Н-2 распределены пятнами по всей поверхности клеток. Пятна отстоят друг от друга примерно на 1000—3000 Å. Эти расстояния слишком велики для сцепления антителами (диапазон сцепления 140 Å) или реакции по типу сэндвича (диапазон около 420 Å). Указанные участки Н-2 не агрегируются и не образуют колпачка, вероятно, вследствие слишком больших расстояний между пятнами антигена.

Raff. Я не согласен с тем, что о пятнистом распределении поверхностных антигенов или рецепторов, обнаруженном при помощи поливалентных антител или лигандов, говорят, как будто бы это истинное распределение.



Рис. 60. Анализ с помощью замораживания и протравливания клеток мышиногo тимуса после экспозиции с мышинным анти-Н-2 и конъюгированным с ферритином антимышиным иммуноглобулином. Антигены Н-2 обнаруживаются в виде пятен. Сходные результаты получены при прямой реакции с использованием сыворотки анти-Н-2, меченной ферритином ("J. exp. Med.", 1972, v. 135, p. 267).

De Petris и я установили, что такого пятнистого распределения нельзя наблюдать, если пользоваться одновалентным Fab-фрагментом антииммуноглобулина, меченым ферритином. С другой стороны, цельный антиммуноглобулин даже при 4°C индуцирует ясно выраженное образование пятен. Те исследователи, которые утверждают, что пятнистое распределение истинное, а не артефакт, обязаны теперь доказать эту же пятнистость при использовании моновалентных реагентов.

Те очень немногочисленные клетки в тимусе, на поверхности которых легко обнаружить иммуноглобулин и которые, по мнению Унапе, являются, возможно, В-клетками, по своей морфологии отличаются от В-клеток в периферических лимфоидных тканях. Таким образом, они либо представляют малую субпопуляцию В-клеток, либо принадлежат к другому типу,

например являются стволовыми клетками с пассивно поглощенным антиглобулином.

Я хочу задать вопрос Унапие в отношении клеток, связывающих гемоцианин в тимусе, которые, видимо, связывают больше молекул гемоцианина, чем селезеночные В-клетки. Если это действительно тимусные лимфоциты, связывающие гемоцианин, то, очевидно, в селезенке можно обнаружить Т-клетки, связывающие гемоцианин. Удалось ли Унапие подавить клетки, связывающие гемоцианин в селезенке с помощью анти- θ -сыворотки и компонента?

Унапие. Пока я не поставил такого опыта. Распределение иммуноглобулина или других рецепторов может изучаться с помощью бивалентных антител при $2-4^\circ\text{C}$, в условиях, когда агрегация минимальна. Очень важен строгий контроль температуры в течение всего опыта. Как только клетки нагреваются, происходит агрегация.

Raff. Однако я точно припоминаю, что рис. 54, показанный Унапие, представлял собой ауторадиограмму, где селезеночные клетки метились при 4°C йодированным антииммуноглобулином и распределение было явно пятнистым. Ту же картину мы видели при мечении антииммуноглобулином с ферритином при 4°C .

Унапие. При $2-4^\circ\text{C}$ меченый ферритином антииммуноглобулин распределен гомогенно без агрегации.

Raff. В таком случае ваши наблюдения весьма отличаются от наших. Я считаю несомненным, что пятнистость может быть индуцированным перераспределением. С другой стороны, мне трудно себе представить, что диффузное распределение могло бы быть артефактом.

Председатель Rajewsky. Пятнистость — это явление, безусловно, интересное. Но мне кажется, что теперь можно воздержаться от дальнейшего обсуждения этого явления.

Landy. Я бы хотел вернуться к распределению продуктов Н-2 на Т-клетках, будь это артефакт или нет. Сравнивал ли Унапие его экспериментальную модель с реконструкцией клеточных срезов, описанной Stackpole, Boyse и Old? Они нашли характерное пятнистое распределение. Пробовал ли Унапие расположить свои клетки рядом со схемой Stackpole, и если да, то сопоставимы ли они?

Унапие. Карта Н-2 на Т-клетках, составленная Stackpole и соавт., совпадает с нашими результатами. На их карте периферических лимфоцитов распределение маркеров было более массивным, плотным, но это можно объяснить наличием на мембранах мышиноного иммуноглобулина, помимо участков Н-2.

Cohn. Несколько лет назад мы прекратили заниматься вопросом о распределении Н-2К и Н-2D, решив, что на поверхности мембраны имеются участки К и участки D, два эти участка не зависят друг от друга. Я имею в виду исследования Boyse и соавт., которые проводили опыты с перекрестным напыщением антителами против К и D. Я хотел бы, чтобы сейчас специалисты в этой области сказали нам, считают ли они по-прежнему, что К и D независимо друг от друга присутствуют на мембране?

Cerrellini. Думаю, что я могу ответить на вопрос Cohn, если допустить аналогию между LA и FOUR (два известных локуса системы HL-A) и D и К у мыши. Мы индуцировали образование колпачка и пятен при помощи моноспецифической антисыворотки к HL-A, а затем после промывания кроличьей антисывороткой к человеческому иммуноглобулину (анти-HL-A сыворотки, антисывороткой к человеческому иммуноглобулину (анти-HL-A сыворотки, антисывороткой к человеческому иммуноглобулину (анти-HL-A сыворотки, даже если они бивалентны, плохо вызывают образование колпачка) на лимфоцитах дигетерозиготы. После этой обработки только продукт HL-A, со-

ответствующий использованной анти-НL-A сыворотке, но не другие три продукта НL-A стал нечувствителен к дальнейшему добавлению антисыворотки и комплемента (их клетки не лизировались).

Мы объясняем это тем, что 4 гена НL-A продуцируют 4 разных популяции молекул, которые независимо друг от друга движутся на клеточной поверхности. Напротив, детерминанты, контролируемые одним и тем же геном, а следовательно, вероятно находящиеся на одном и том же полипептиде, как и аллотипические факторы Gm³ и Gm² в цепях γ_1 иммуноглобулина человека, образуют колпачки совместно. Недавно эти результаты были подтверждены при визуальном исследовании с помощью двух разных светящихся красок (Bernoco, Cullen, Scudeller, Trinchieri, Ceppellini. «НL-A Molecules at the Cell Surface». Histocompatibility Testing, Munksgaard, Copenhagen, 1972).

Lilly. Я также могу добавить свои наблюдения к вопросу, поднятому Cohn. Мы провели предварительные опыты вместе с Neaurogt и Kaurilsky, основанные на комплексообразовании красных и зеленых светящихся молекул с антителами, моноспецифическими для детерминант конца κ или H-2D. Опыты ставились в нескольких комбинациях, и я назову здесь только один пример. На первом этапе клетки инкубировались с антисывороткой против D-конца в комплексе с красной краской, а затем производилась инкубация в тепле так, чтобы образовался колпачок. Далее производилась инкубация на холоду со специфичностью против κ -конца в комплексе с зеленой краской. Зеленая флюоресценция была равномерно распределена на поверхности клетки вместе с образованием красного колпачка. Пока эти опыты были поставлены только на гомозиготных клетках. Мы еще не имеем результатов опытов с гетерозиготными клетками.

Raff. Поставленный опыт, описанный Lilly, весьма интересен. В течение 6 мес мы пытались провести такой опыт и по техническим причинам потерпели неудачу. Надо отдавать себе отчет в том, что изучение подвижности этого рода не обязательно аналогично опытам с составлением карты и с блокирующим эффектом. При блокирующих опытах Boyse и соавт. тимусные клетки покрываются одним видом аллоантител и изучается дальнейшее поглощение другого вида аллоантител. Если два вида аллоантител взаимно блокируют поглощение друг друга, то соответствующие аллоантигены, как предполагается, находятся рядом на мембране. В подобных опытах продукты локусов T1a и H-2D локализовались бок о бок. С другой стороны, Boyse и соавт. много лет назад показали, что если обработать тимоциты комплементом и антителами против антигена T1, то T1 удаляется с мембраны, но H-2D сохраняется и количество его увеличивается. Таким образом, ассоциации, обнаруженные при этом, могут быть лабильны и могут нарушаться взаимодействием антител с антигеном, а следовательно, не выявляться при изучении подвижности. Если два антигена сегрегируются вместе в виде пятен или колпачка, то, по всей вероятности, они являются частью одной и той же молекулы, хотя пока я не могу доказать это свое мнение. Пока установлено, что поверхностный иммуноглобулин движется независимо от антигенов гистосовместимости и различных рецепторов для митогена (ФГА, конканавалина А и локаноса).

Председатель Rajewsky. Опыты Boyse и сотруд., видимо, явно доказывают, что какая-то ассоциация существует, хотя и может быть нарушение.

Raff. Очень трудно объяснить наблюдения Boyse, что аллоантигены на мышинных тимоцитах не имеют случайного распределения. Однако возможно, что их расположение является статической ассоциацией, т. е. подвиж-

ные белковые молекулы соединяются вместе и образуют свободные нековалентные связи.

Упапе. Очень важен вопрос о том, движутся ли несколько рецепторов независимо друг от друга или они взаимосвязаны. Пока мы установили, что рецепторы конканавалина А, Н-2, иммуноглобулин и антигены, реагирующие с АЛС, движутся независимо друг от друга.

Председатель Rajewsky. Для полноты картины я хочу сказать, что Hämmerling вместе с нами проводил исследования примерно такого же рода, как Упаве («Eur. J. Immunol.», 1971, v. 1, p. 447). У него поместились практически все периферические лимфоциты с помощью ряда различных антииммуноглобулиновых сывороток, включая анти- κ , анти-F(ab)' и анти- λ . Таким образом, эти исследования не ограничены какой-то одной особой антисывороткой, а проведены с целой панелью антисывороток, давшей аналогичные результаты. Было бы очень хорошо, если бы обменяться реагентами с Hämmerling, чтобы внести ясность в этот вопрос.

Упаве. Wagner и его группа нашли иммуноглобулин на Т-клетках при помощи отобранных антител и весьма чувствительной методики. Насколько мне известно, никто, кроме Hämmerling, не находил иммуноглобулин, пользуясь обычными методами и всеми антисыворотками. Я не могу объяснить этого противоречия. Мы применяли те же методы, включая гибридные антитела, с совершенно отрицательным результатом. Я уже говорил об отрицательном анализе, проведенном Кагновски методом замораживания и протравливания.

McDevitt. Какую концентрацию иммуноглобулиновых молекул нашел Hämmerling на Т-клетках?

Председатель Rajewsky. Точно дать ответ McDevitt трудно. Если рассматривать всю популяцию лимфоцитов, то распределение поверхностной метки было гетерогенным, начиная от нескольких маркерных частиц до почти полного покрытия периметра клетки. Однако на этом этапе невозможно было сопоставить плотность мечения с субпопуляциями лимфоцитов.

Nisonoff. В начале этого года Hämmerling доложил о своей работе на конференции иммунологов. Он обнаружил довольно высокую плотность иммуноглобулиновых молекул на Т-клетках. Он указал очень высокую цифру.

Simonsen. Краткий вопрос к Упаве. Ставились ли эти опыты со связыванием антигена Т-клетками при разных температурах или только при одной температуре.

Упаве. Только на холоду, при 4° С.

Simonsen. Нельзя ли было бы провести эти опыты и при более высокой температуре?

Упаве. Я умышленно избегал тестов при 37° С, так как мы знаем, что в популяциях селезеночных клеток тесты при этой температуре ведут к быстрому образованию колпачков.

Simonsen. Полагаю, что этот вопрос возможно является важным. Если попытаться обнаружить гетерогенность популяции Т-клеток путем абсорбции на монослоях, как впервые сделал Брондз в Москве (Brondsz, Golberg «Folia, Biol.», 1970, v. 16, p. 20), то это удастся только при 37° С или при комнатной температуре, но не при 4° С, согласно данным Wiggell из Стокгольма, который успешно воспроизвел такое поглощение. Возможно, что Т-клетки, связывающие антиген, оказались бы значительно более многочисленными, если бы Упаве исследовал их при 37° С.

Председатель Rajewsky. Мы подошли вполне логично к вопросу о тех строгих опытах, которые нужны для того, чтобы решить, присутствует ли

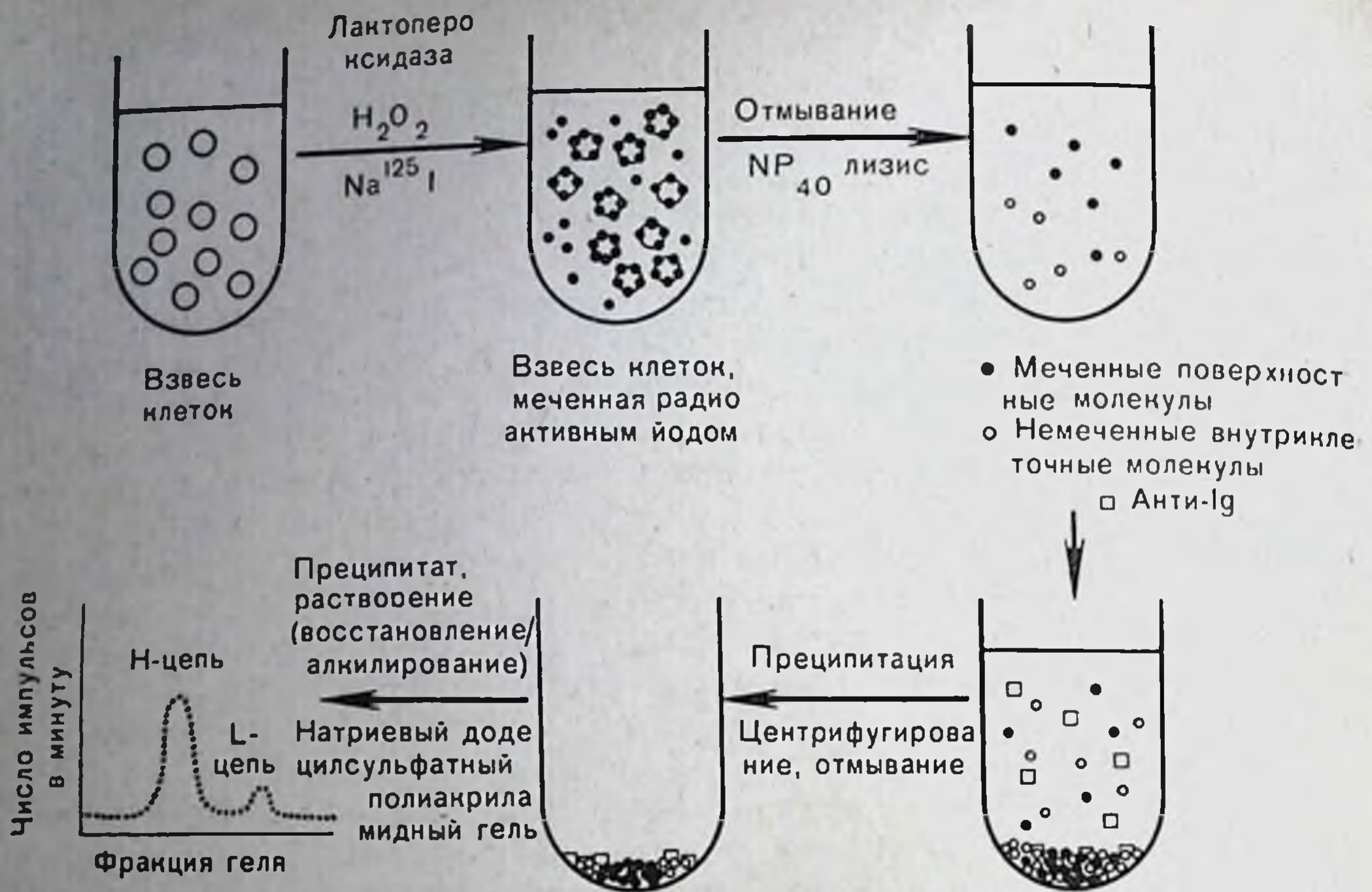


Рис. 61. Техника радиоiodирования, выделения и характеристики иммуноглобулинов, находящихся на поверхности лимфоцитов.

иммуноглобулин на Т-клетках. Унг расскажет нам о своей работе, относящейся к этой спорной области.

Унг. Прежде всего я хочу обсудить вопрос о наличии иммуноглобулина на поверхности тимоцитов и Т-клеток. Исходя из наблюдений Phillips и Morrison («Biochem. Biophys. Res. Comm.», 1970, v. 40, p. 284), установивших, что поверхность интактных эритроцитов можно ферментативно пометить ^{125}I , мы разработали метод выделения меченого иммуноглобулина с поверхности лимфоцитов (Baig e. a. «J. Immunol.», 1971, v. 106, p. 1133). Этот метод вкратце изображен на рис. 61. Взвесь лимфоцитов метилась с помощью лактопероксидазы и малого количества перекиси водорода ^{125}I . Промытые меченые клетки лизируются в неионном моющем средстве. Таким образом, получается раствор немеченых внутриклеточных молекул и меченых поверхностных молекул. Затем они преципитируются антителами в данном случае против иммуноглобулинов. Промытый преципитат растворяется в додецилсульфате натрия (ДСН), восстанавливается и алкилируется и подвергается электрофорезу в полиакриламидном геле в ДСН. Я хотел бы рассказать о наших данных о распределении иммуноглобулинов на клеточной поверхности тимоцитов, костномозговых клеток и популяций, происходящих от них. Эти опыты были поставлены в мсей лаборатории Vitetta совместно с Nussenzweig и Bianse. Результаты вкратце изложены в табл. 77. Если от тимуса отделялись паратимические лимфатические узлы, то тимоциты были «отрицательны на иммуноглобулин». К другим «отрицательным» субпопуляциям относились θ -положительные клетки лимфатических узлов, которые метились ^{125}I , убивались анти- θ -сывороткой и комплементом и изучались в градиенте плотности альбумина; линия θ -положительных клеток лимфомы, полученная от Nogibata; спленоциты КРЛ- и активированные θ -положительные спленоциты.

ТАБЛИЦА 77

Распределение Ig в субпопуляциях лимфоцитов

Тип изученных клеток	Наличие Ig
Тимоциты	0
Тимоциты, резистентные к кортизону	0
θ^+ лимфоциты	0
θ^+ клетки лимфомы	0
Спленоциты без рецепторов для комплемента	0
T-активированные, θ^+ спленоциты	0
Клетки костного мозга	+
Спленоциты с рецепторами для комплемента	+
θ^- лимфоциты	+

Наоборот, иммуноглобулин легко выявлялся на костно-мозговых клетках или В-клетках. Это были спленоциты КРЛ⁺, выявленные по принципу образования розеток в градиенте плотности альбумина и θ -отрицательные лимфоциты. Говоря об отрицательном результате, я имею в виду, что при преципитации с антииммуноглобулином и в контрольном преципитате осадок содержал эквивалентное количество метки и что электрофорез на полиакриламидном геле восстановленного и алкилированного специфического преципитата не показал пиков тяжелых и легких цепей.

Кстати, мы производим преципитацию по сэндвич-методу. Таким образом, контролем служит гипериммунная кроличья антисыворотка против постороннего антигена.

На рис. 62 показаны результаты, полученные с активированными Т-клетками: 10^8 -активированных в РТПХ Т-клеток (90% θ -положительных) дали отрицательные результаты. Напротив, нормальные селезеночные клетки дали большие пики μ и легких цепей.

В литературе появился ряд сообщений, согласно которым, иммуноглобулин является рецептором Т-клеток, поэтому мы попытались представить себе, каким образом мы могли не заметить иммуноглобулина на Т-клетках. Действительно, иммуноглобулин клеточной поверхности может быть свободно связан и удаляться при тщательном промывании. Однако более осторожное промывание или попытка регенерировать предполагаемый рецептор в среде, лишенной сыворотки, перед йодированием не изменили отрицательных результатов. Возможно, рецептор скрыт в плазматической мембране, как предполагают другие авторы. Это предположение маловероятно, так как в нашей лаборатории Schenkein, изучавший энзимологию реакции с лактопероксидазой, продолжил прежние наблюдения и установил, что единственным или основным медиатором мечения является молекулярный йод. Действительно, он мог применить лактопероксидазу в мешке для диализа и пометить белки снаружи. Очевидно, молекулярный йод может йодировать любые тирозиновые группы на клеточной поверхности. Тем не менее, когда мы йодировали лизаты тимусных клеток и метили тимоциты ³H-тирозином, иммуноглобулин не был найден. Затем мы предположили, что клеточная концентрация, применяемая для йодирования, не оптимальна. Мы проводили йодирование при концентрациях от 10^5 до 10^9 клеток на 1 мл. Результаты оказались отрицательными. Мы предположили, что, возможно, молекула антитела нерастворима в моющем средстве. Marchalonis и соавт. («J. Exp Med.», 1972, v. 135, p. 956) описали метод экстраги-

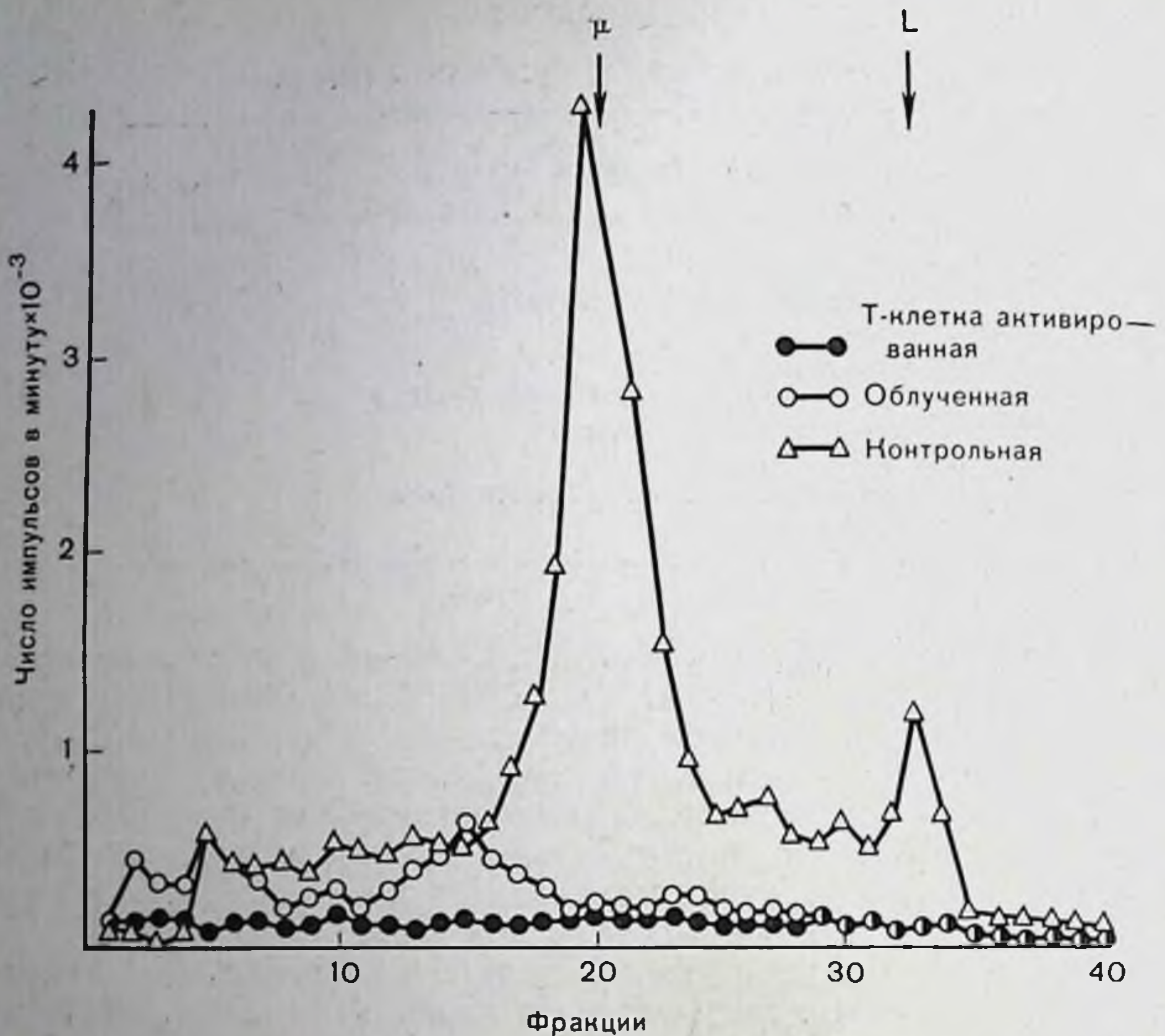


Рис. 62. Электрофорез анти-Ig-преципитатов, полученных из лизатов радиоактивно меченных активированных Т-клеток селезенки и контрольных клеток (от нормальных и облученных мышей). Преципитаты восстановлены и алкилированы перед электрофорезом. Показана позиция М- и L-цепей при электрофорезе в геле.

рования 9M мочевиной и меркаптоэтанолом. Мы установили, что при таком экстрагировании в ядерном осадке утрачивается 80% преципитируемой кислотой радиоактивности, при использовании нашего метода (с 5% NP40) терялось только 10%.

Однако, если лизаты тимусных клеток отстаивают, то образуется преципитат. При обработке этого преципитата трипсином и сопоставлении его с мышинным IgM не найдено признаков структурного сходства.

Мы учитывали возможность того, что специфичность антител может быть не соответствующей, однако это маловероятно, так как преципитация проводилась в растворе, а не между антителами и клетками. Обычно применяемая нами антииммуноглобулиновая антисыворотка содержала специфичности против μ , γ , κ и λ . Однако, кроме того, мы получили от Dutton антисыворотку, блокирующую функцию Т-клеток *in vitro*. И при применении этой антисыворотки получены отрицательные результаты с тимоцитами.

Наконец, мы задались вопросом, достаточно ли чувствителен наш метод? Vitetta йодировала смесь, содержащую небольшое количество В-клеток (5×10^6) с большим количеством тимоцитов (2×10^9), а также такое же количество тимоцитов, взятое в отдельности.

Как видно на рис. 63, сами тимоциты давали отрицательный результат, тогда как в смеси, содержавшей одну В-клетку на 400 тимоцитов, довольно легко выявлялись μ и легкие цепи. Если на одну В-клетку насчитывается

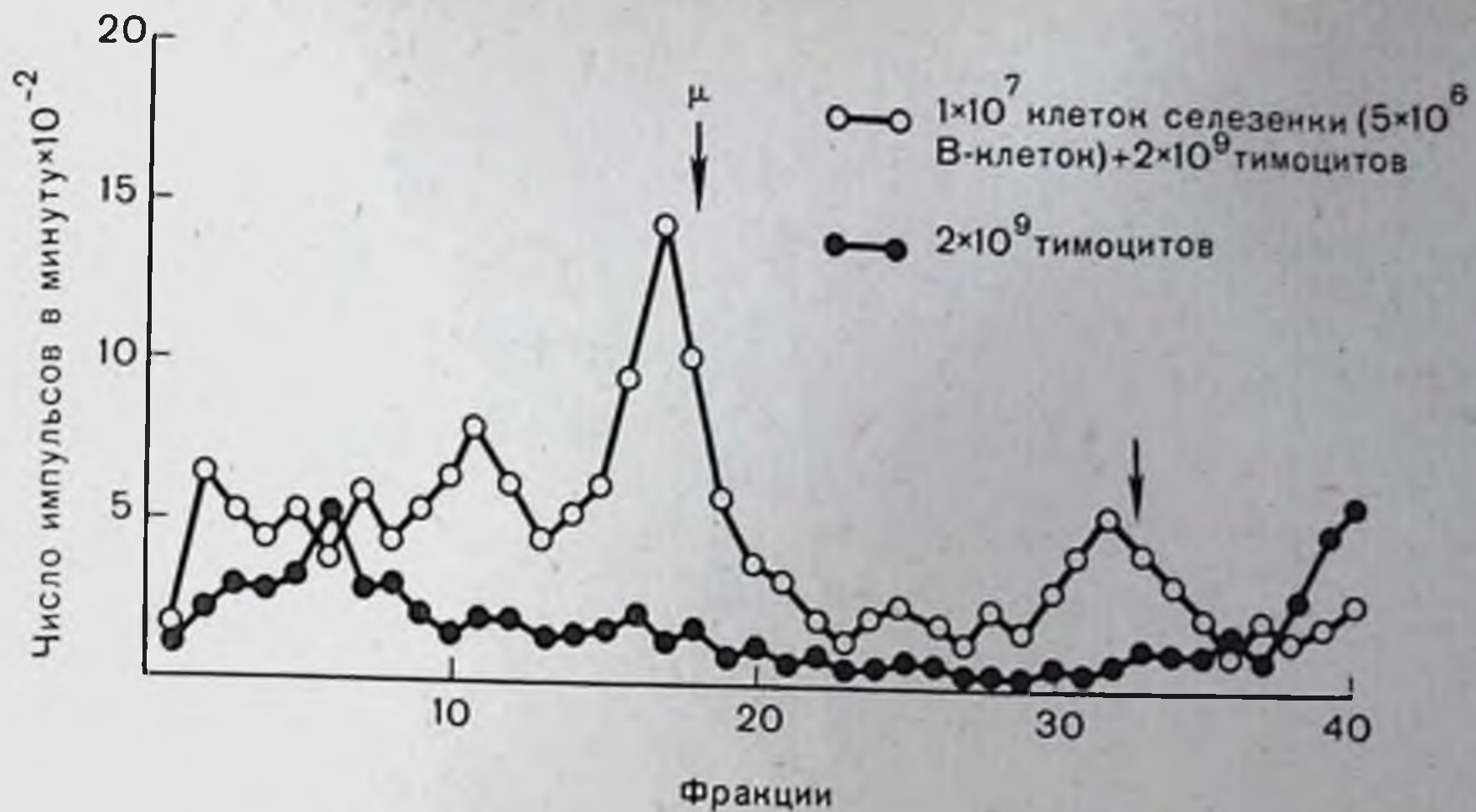


Рис. 63. Электрофорез анти-Ig-преципитатов, полученных из лизатов радиоактивно меченных тимоцитов и из смесей тимоцитов и клеток селезенки (см. рис. 62).

около 100 000 иммуноглобулиновых молекул, если все тимоциты имеют иммуноглобулин и если реакция йодирования не зависит от плотности иммуноглобулина на клетку, мы должны были бы обнаружить 250 иммуноглобулиновых молекул на тимоцит.

Вскоре после того как были завершены эти исследования, Vitetta сделала неожиданное наблюдение. Она метила тимоциты ^3H -тирозином, чтобы изучить секрецию клеточных поверхностных белков. Она исследовала инкубационную среду на иммуноглобулин и обнаружила присутствие его следов. Ранее мы не исследовали секрецию тимуса и так как прохождение через плазматическую мембрану представляет собой весьма эффективный способ биологического очищения, возможно, что мы прошли мимо иммуноглобулина, так как исследовали только лизаты.

Чтобы продолжить это наблюдение, мы задались вопросом, что секретирует иммуноглобулин: θ -несущие клетки или клетки, лишенные θ -антигена. Результаты типичного опыта приведены в табл. 78. Тимусные клетки

ТАБЛИЦА 78

Синтез белка и Ig клетками тимуса BALB/c (θ -СЗН)*

Обработка	Остающиеся клетки, %	Белок, %	Ig, %	Отношение изменений Ig/белок
Анти- θ -АКР(контроль)	99—100	100	100	—
Анти- θ -СЗН	1—2	3	85	28,3
Анти-К	98—99	100	35	0,35

* 10^8 клеток тимуса, меченных ^3H -тимидином, дали $1,5 \times 10^7$ имп/мин для белка и $1,4 \times 10^5$ имп/мин в Ig (1%).

BALB/c θ -СЗН были предварительно обработаны анти- θ -АКР (контроль) или анти- θ -СЗН и комплементом. Обработка анти- θ -АКР (контроль) не привела к гибели селезеночных клеток. Включение ^3H -тирозина в белок и в специфически преципитируемый иммуноглобулин (специфический преципитат минус контрольный преципитат) было принято за 100%. Анти-

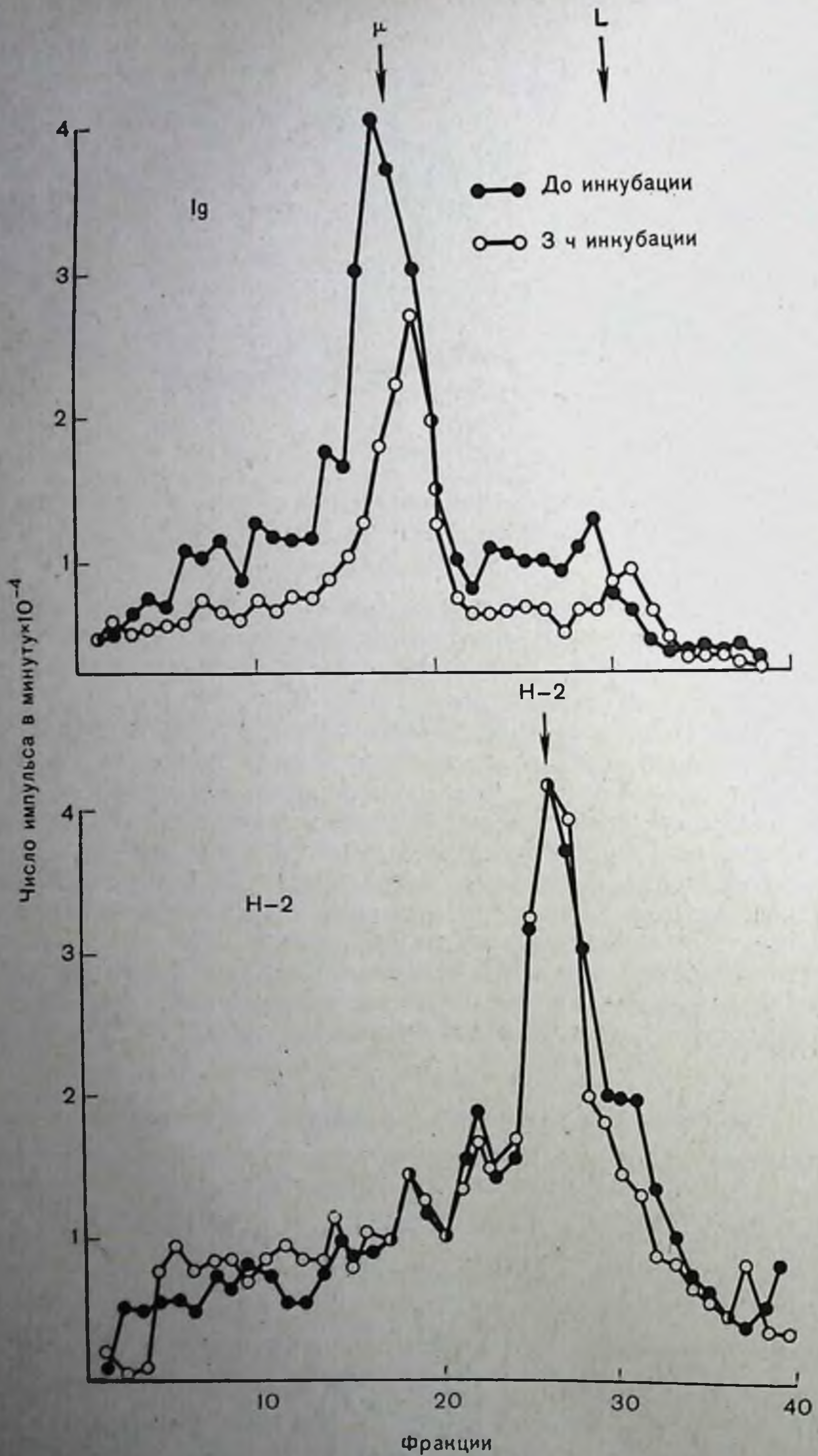


Рис. 64. Радиодоброуаный Ig лимфоцитов селезенки мышей H-2^a (A/J), инкубированных *in vitro* в течение 3 ч. Образцы лизатов и секрета брали до и после инкубации и Ig преципитировали сэндвич-методом (с использованием кроличьего антмышинного и козьего антикроличьего Ig). Надосадочную жидкость преципитатов затем обрабатывали сывороткой анти-H-2^a и комплексы преципитировали козьим антмышинным Ig. Анти-Ig и анти-H-2^a преципитаты растворяли, восстанавливали и подвергали электрофорезу в натрий-додещилсульфатакриламидном геле.

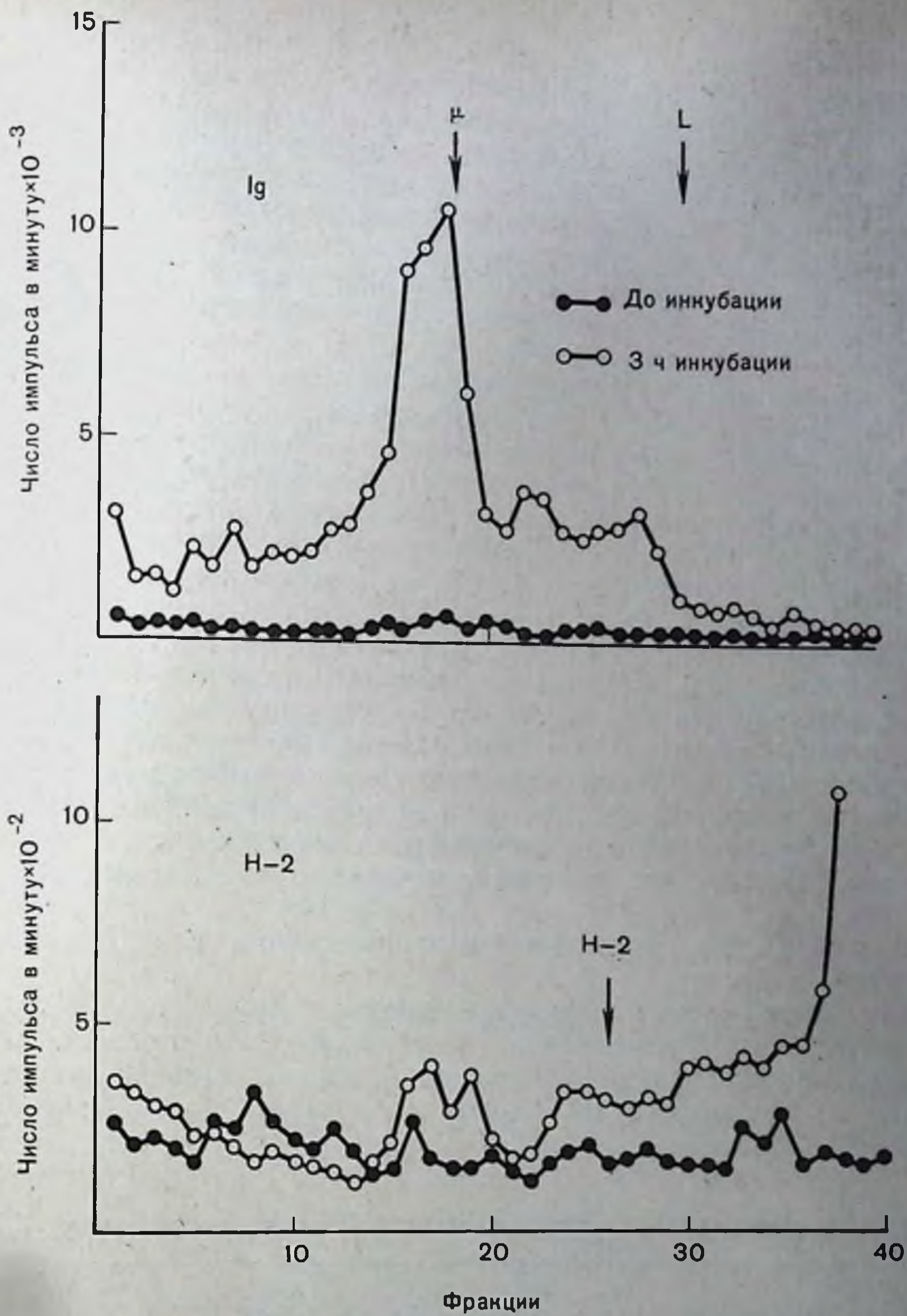


Рис. 65. Радиойодированный поверхностный Ig и антиген H-2 из инкубационной среды лимфоцитов селезенки мышей A/J после 3 ч культивирования (см. рис. 64).

0-СЗН убивала практически все клетки, подавляла почти весь синтез белка, но подавляла синтез иммуноглобулина лишь в незначительной степени. Наоборот, анти-К убивала только 1% клеток, не влияла на белковый синтез и значительно снижала иммуноглобулиновый синтез. Когда секреты были объединены от нескольких опытов, то специфические преципитаты имели достаточную радиоактивность для анализа на полиакриламидных гелях. Обнаруженные γ , μ и легкие цепи аналогичны таковым в секретах меченых В-клеток из селезенки. Я считаю этот опыт весьма убедительным доказательством того, что следы иммуноглобулина, секретлируемые препаратами тимусных клеток, обусловлены примесью В-клеток.

Обе группы данных я объясняю тем, что на поверхности тимоцитов и Т-клеток иммуноглобулина нет или почти нет и тимоциты не синтезируют или почти не синтезируют иммуноглобулина. Хочу подчеркнуть, что я не сразу пришел к этому выводу. Помню, что когда я подводил итоги 2-й конференции в Brook Lodge по медиаторам клеточного иммунитета, я сказал, что, по моему мнению, невозможно представить себе какую-либо молекулу, кроме иммуноглобулина, ответственную за специфичность Т-клеток. Однако сейчас я думаю, что мы должны считать, что вопрос о характере рецептора не решен. Возможно, он имеет другой характер и не состоит из иммуноглобулина?

Хочу сделать еще последнее замечание, относящееся к данным других авторов, по мнению которых с Т-клетками связан 8S IgM. Рис. 64 и 65 показывают, что обработанные радиоактивным йодом селезеночные клетки в течение 3 ч инкубации выделяют около $1/3$ своего поверхностного иммуноглобулина. Интересно, что аллоантигены H-2 не выделяются той же порцией клеток в течение этого периода инкубации. Таким образом, даже если в секретах Т-клеток присутствует 8SIgM, он может исходить от примеси В-клеток.

Wagner. Выступая сразу после Uhr, я хотел бы сказать с самого начала, что все экспериментальные методы, примененные в нашей лаборатории, привели нас к выводу, что на поверхности Т-клеток присутствует что-то, вступающее в антигенную реакцию с некоторыми антииммуноглобулиновыми сыворотками. Таким образом, мы утверждаем, что Т-клетка синтезирует какой-то иммуноглобулиновый продукт. Многие из наших данных опубликовано, но я хотел бы вновь повторить их для участников конференции, так чтобы облегчить сопоставления, которые захотят сделать многие из вас.

Исследование, которое я опишу, было проведено вместе с Harris, Bankhurst, Rouse и Dwyer.

Прежде всего мы полностью соглашаемся с мнением, что в тимусе присутствуют типичные В-клетки. Я не согласен с Raff, что это стволовая клетка, так как Basten, пользуясь маркером рецепторов комплексов антиген—антитело (не находящихся на Т-клетках), доказал, что тимус некоторых

ТАБЛИЦА 79

Эффект антииммуноглобулиновой предобработки клеток, опосредующих РТПХ

Преобработка клеток донора	Селезеночный индекс химер	Среднее
Сбалансированный солевой раствор	1,7; 2,1; 2,3; 2,3; 2,4; 2,6; 2,7	2,3
Специфическая кроличья сыворотка против тяжелых цепей (μ , γ , γ^2 , α)	2,5; 3,4; 3,5; 5,3; 1,9; 2,3; 2,7	3,1
Кроличья сыворотка против легких цепей (НРС-2)	1,0; 1,1; 1,1; 1,1; 1,3; 1,8; (2,7) ^a	1,2
Кроличья сыворотка против НРС-3 (IgG _{2a})	1,3; 1,1; 1,2	1,2
Кроличья сыворотка против НРС-1 микросом	1,2; 1,1; 1,0; 0,9; 1,2; 1,2 (2,5; 3,4) ^b	1,1
Неабсорбированная кроличья сыворотка против миеломных белков	3,4; 2,5; 2,3; 2,4; 1,8	2,5

^a Образец сыворотки немуннизированного животного.

^b Предварительно абсорбированы очищенными мышными L-цепями (BJP).

линий мышей содержит от 0,2 до 2% клеток, реагирующих при этой пробе (величины колеблется в зависимости от линий мышей).

Вначале мы ставили функциональные тесты по подавлению РТПХ. Проведены два исследования: одно на мышах, другое на курах. Я делаю совершенно одни и те же выводы из своих исследований.

Табл. 79 подчеркивает, что лишь некоторые антиглобулиновые сыворотки подавляют Т-клетки. Полученные результаты показывают селезеночные индексы химер, где каждая величина является средней для одной экспериментальной группы, т. е. средней для 6—8 мышей. Три антииммуноглобулиновые сыворотки заметно подавляли, если не снимали совсем реактивность Т-клеток в индукции РТПХ. В одном опыте этот результат не получен, но в общем подавление было воспроизводимо. Кровь, взятая у этих кроликов до иммунизации, не подавляла реакции, основным контролем служил препарат антисыворотки, предварительно абсорбированный очищенными мышинными легкими цепями. Эта абсорбция полностью лишала сыворотку подавляющего действия. Затем, мы видим, что ряд других антииммуноглобулиновых сывороток, включающий три разные антисыворотки, обладающие активностью против легких цепей в одинаковых концентрациях (измерено при помощи проб на радиоиммунную преципитацию), не подавляли РТПХ, так же как использованные нами антисыворотки против тяжелых цепей.

Я хотел бы сказать, что у нас есть также одна антисыворотка против куриного иммуноглобулина, которая блокирует образование очагов на куриной хорионлантоисной мембране. В этой реакции образцы крови взрослых кур инокулируются в хорионлантоисную мембрану куриных эмбрионов. В табл. 80 показано (в процентах) среднее количество очагов в экспе-

ТАБЛИЦА 8)

Подавление РТПХ у птиц предварительной антиглобулиновой обработкой лимфоцитов

Антисыворотка	Активность	Преабсорбция антисыворотки	РТПХ ^а
R71	Против легких цепей	NIL	22,7
R71	» » »	Тимоциты	30,0
R71	» » »	L-цепи или IgG цыпленка	85,2
R76, 77	» фабрициевой сумки	Тимоциты	120,0
R78, 79, 43	» тимуса	Клетки фабрициуса сумки	14,0
R70, 45	» легких цепей	NIL	105,0
R75, 24	» гамма-цепей	NIL	89,0
R69, 68, 6P1	» мю-цепей	NIL	80,0

^а Группа, обработанная антисывороткой процент от контроля, обработанного НКС (в среднем 4—7 отдельных экспериментов).

риментальной группе по сравнению с контролем. Для контроля кровь предварительно обрабатывали нормальной кроличьей сывороткой. Кроличья антисыворотка против куриного тимуса, абсорбированная нормальными клетками фабрициевой сумки, подавляла реакцию. Антисыворотка против клеток фабрициевой сумки, абсорбированная тимусными клетками, не вызывала подавления. Таким образом, мы имеем дело с иммунной реакцией, опосредованной Т-клетками. Но одна кроличья антисыворотка против ку-

риных легких цепей также уменьшала количество очагов примерно до 25% от контроля. Это обнаружено при 6—7 разных опытах и во всех случаях эта сыворотка давала подавление. Я хочу подчеркнуть, что для исследований подобного рода в основном в качестве контроля надо пользоваться тем же препаратом антисыворотки, предварительно абсорбированным очищенным иммуноглобулином. Мы провели такую абсорбцию и подавляющая активность сыворотки в значительной мере была снята. Абсорбция тимусными клетками не снимала эффекта подавления. Однако мы имеем также две другие антисыворотки против куриных легких цепей, имеющие такие же титры согласно радиоиммунным пробам, но не подавляющие РТПХ. Различные антисыворотки против тяжелых цепей также не дают эффекта. Я сделал бы общий вывод, что те сыворотки, которые подавляют РТПХ, действуют благодаря их антииммуноглобулиновой активности, а не из-за какой-либо неспецифической цитотоксичности для Т-клеток. Подавляющая активность зависит не только от количества антител против легких цепей в сыворотке; скорее дело в качественных различиях антисывороток.

ТАБЛИЦА 81

Меченные ^{125}I -антииммуноглобулиновым белком лимфоциты от голых и нормальных мышей^а

Реагент	Лимфоциты грудного протока (ЛГП) голых мышей		ЛГП нормальных мышей	
	% клеток ^б	средний %	% клеток ^б	средний %
Сыворотка против поливалентных тяжелых цепей	86,0; 87,3; 89,0	87,4	26,0; 33,0; 18,0	25,7
Блокированная сыворотка против поливалентных тяжелых цепей	0	0	0	0
Анти- γ -сыворотка	90,0; 91,6; 100	93,9	27,0; 27,0; 18,0	24,0
Блокированная анти- γ -сыворотка	0	0	0	0
Анти- γ_2 ^в	29,0; 43,0; 28,0	33,3	12,0; 18,0;	15,0
Анти- μ ^в	78,0; 76,0; 76,3	76,3	25,0; 28,0; 18,0	23,6
Анти- α ^в	45,0; 40,0; 51,0	45,3	17,0; 20,0	18,5
Нормальный кроличий глобулин	6,0; 2,1; 2,0	3,0	0; 2,0	1,0

^а 5×10^6 жизнеспособных клеток инкубировали при 0°C в течение 1 ч с 6500—8000 мкг ^{125}I -антииммуноглобулинового IgG. Эти условия обеспечивают почти оптимальный процент мечения клеток.

^б Каждое значение получено из клеточной суспензии, собранной от 2—5 голых мышей. Мечение ЛГП от нормальных мышей выполнено подобным образом с теми же реагентами.

^в Уже показано в предварительных экспериментах, что эти реагенты специфически блокируются очищенными иммуноглобулинами.

В табл. 81 приведены наши результаты, полученные с В-клетками и вполне соответствующие данным Унапе. Наша очищенная популяция В-клеток взята от лишенных тимуса (голых) мышей и содержит около 97% В-клеток. Антисывороткой против γ -глобулина метится около 94% клеток. Это специфическая реакция антисыворотки, так как ее связывающая активность теряется после предварительной обработки очищенными легкими

цепями. Результаты, полученные с В-клетками, также показывают, что существует популяция клеток, имеющих на поверхности более одного класса иммуноглобулиновых тяжелых цепей.

Следует подчеркнуть, что в опытах с Т-клетками необходимо пользоваться иными условиями для ауторадиографии. Если ауторадиограммы экспонируются в течение 6—8 дней, то в тимусе можно обнаружить лишь небольшой процент меченых клеток. В табл. 82 показаны результаты, полученные

ТАБЛИЦА 82

Мечение мышинных Т-лимфоидных клеток антиглобулинами

Препараты ^{125}I IgG	% меченых клеток ^б	
	тимус	т-ЛГП
Анти- γ	17,0	49,0
Анти γ (блокированные γ)	0	0
Сыворотка против собранных вместе тяжелых цепей	1,3	1,3
НКС	1,0	—

^а 6—8 мкг/10⁷ клеток.

^б Экспозиция ауторадиограммы 54—60 дней.

точно таким же методом, но при продолжительности экспозиции ауторадиограмм около двух месяцев. Именно в этих условиях в тимусе можно обнаружить около 17% меченых клеток, т. е. значительно больше, чем возможная примесь В-клеток. Это наблюдение специфично также в том смысле, что блокированные реагенты не «метят» клетки. В данном случае поливалентные антисыворотки против тяжелых цепей также не дают мечения клеток.

Пользуясь популяцией Т-клеток, взятой из лимфы грудного протока облученных мышей F₁, предварительно получивших тимусные клетки взрослых животных, причем эта популяция состоит примерно из 99% θ -положительных клеток, мы установили, что по крайней мере половина из них метится антисыворотками против легких цепей и не метится антисыворотками против тяжелых цепей (табл. 82). На основании экспериментов, поставленных в этих двух направлениях, мы полагаем, что на поверхности Т-клеток возможно присутствует какой-то иммуноглобулин. Процент меченых клеток в этих опытах нельзя объяснить примесью В-клеток.

Однако два эти метода не позволяют решить вопроса о том, происходит ли синтез иммуноглобулина или Т-клетки цитофильно связывают сывороточный иммуноглобулин. Поэтому мы решили, что для того, чтобы доказать, что именно проявляется на поверхности Т-клеток, необходимо изучить синтез. Мне кажется, что на рис. 66 нам удалось представить продукт гена Ig-1. Здесь изображен радиоиммуноэлектрофорез краткосрочных культур мышинных опухолей. В двух нижних гелях имеется меченая линия, хотя и слабо, а четкая линия в верхнем геле получена от плазмоцитомы. Мы применяли описанную Thorbeck методику краткосрочной культуры (24 ч) фрагментов ткани во вращающихся пробирках вместе с аминокислотами, меченными ^{14}C . При этом результат зависит от секреции и внутриклеточного содержимого, так как клетки были разрушены, повторно экстрагированы, секрет подвергнут анализу, чтобы удалить аминокислоты, и концент-

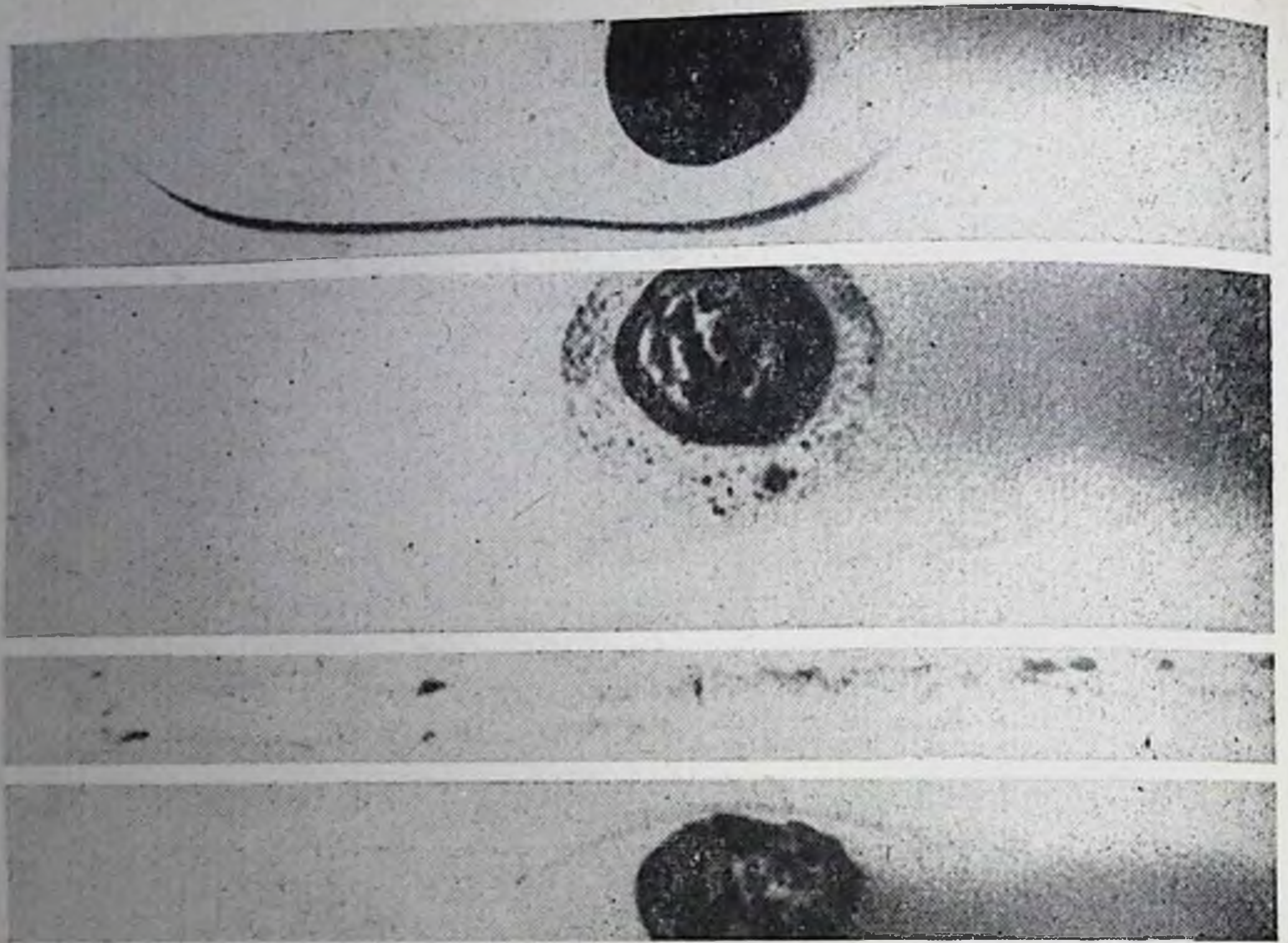


Рис. 66. Радиоиммунный электрофорез мышинной тимомы.

рирован. Эту сложную смесь разделили на фракции в электрофорезе с использованием сыворотки-носителя для получения линий преципитации с поливалентными антиглобулиновыми сыворотками. Затем смесь была приготовлена для ауторадиографии. На рис. 66 показана культура плазмоцитомы (на верхнем геле). В этом случае экспозиция пленки продолжалась только несколько дней. Мы видим интенсивно меченную линию IgG. Наоборот, два нижних геля являются культурами тимом, вызванных облучением, в этом случае рентгеновская пленка подвергалась двухмесячной экспозиции. Мы видим лишь слабо меченную линию, но надо подчеркнуть, что меченой оказывается только определенная часть линии IgG.

Пока еще мы не исследовали подобный материал при помощи ультрацентрифугирования в градиенте из-за слабого включения метки, все же мы можем сказать, что в культурах других видов, например в культуре плазмоцитомы, секретирующей только легкие цепи, такое включение метки указывает на синтез только свободных легких цепей. Показанное распределение метки объясняется тем, что свободные легкие цепи мигрируют иначе, чем интактный иммуноглобулин, но преципитация происходит, так как антисыворотка обладает активностью против легких цепей.

Веласеггаф. Поставлен ли опыт со специальной антисывороткой Wagner или его можно воспроизвести с каким-либо другим аналогичным реагентом?

Wagner. Для проявления радиоиммуноэлектрофореграмм были использованы антисыворотки, примененные для исследования *in vitro* блокады Т-клеточного иммунитета. Пока еще мы не пользовались для преципитации специфической антисывороткой против легких цепей, которая подавляла функцию Т-клеток *in vitro*.

В табл. 83 показаны результаты изучения иммуноглобулинового синтеза в 19 тимоммах, индуцированных облучением. Шесть линий указывают на минимальный синтез легких цепей, выявляемый только после длительной экспозиции ауторадиограмм. В 12 тимоммах за это время синтеза иммуноглобулинов не обнаружено. Одна тимомма (WENI-22) дала специфический синтез IgM.

В табл. 84 приведены результаты мечения поверхностных иммуноглобулинов на WENI-22. Здесь приведен процент меченых клеток антителами

ТАБЛИЦА 83

Синтез иммуноглобулинов лимфоидными опухолями мышей

Происхождение опухоли	Тип	Линия	Синтез иммуноглобулинов ^а
WENI-7	Тимомма ^б	BALB/c	Не определяется
WENI-14	»	То же	То же
WENI-16	»	»	» »
WENI-20	»	»	» »
WENI-22	»	»	IgM
WENI-24	»	»	Не определяется
WENI-26	»	»	Следы L-цепей
WENI-27	»	»	Не определяется
WENI-31	»	»	Следы L-цепей
WENI-56	»	»	L-цепи
WENI-105	»	NZB	То же
WENI-106	»	»	Не определяется
WENI-112	»	»	То же
WENI-113	»	»	» »
WENI-114	»	»	» »
WENI-124	»	»	L-цепи
WENI-126	»	»	То же
WENI-128	»	»	Не определяется
WENI-129	»	»	То же
WENI-2	Лимфома ^в	(NZB × BALB/c) F ₁	L-цепи ^в
WENI-5	То же	То же	L-цепи, следы IgM
WENI-6	»	(NZB × 57BL) F ₁	IgM
WENI-37	»	То же	L-цепи ^в

^а Определяется радиоиммуноэлектрофорезом клеток после кратковременного культивирования с ¹⁴C-аминокислотами.

^б Лимфоидные тимоммы, индуцированные облучением.

^в Спонтанные лимфомы, появляющиеся в селезенке или лимфотических узлах.

Тимоммы: 12/19 синтез Ig не определяется; 6/19 минимальный синтез L-цепей; 1/19 минимальный синтез IgM.

ТАБЛИЦА 84

Поверхностные иммуноглобулины на различных тимоммах мышей

Источник клеток	% меченых клеток			
	Анти-х	х-блокированные	Анти-Н	Н-блокированные
Селезенка (CBA × 57) F ₁	48	2	46	0
Тимус (CBA × C57) F ₁	1	0	1	0
WENI-105-7	0	0	0	0
WENI-22	89	4	90	0

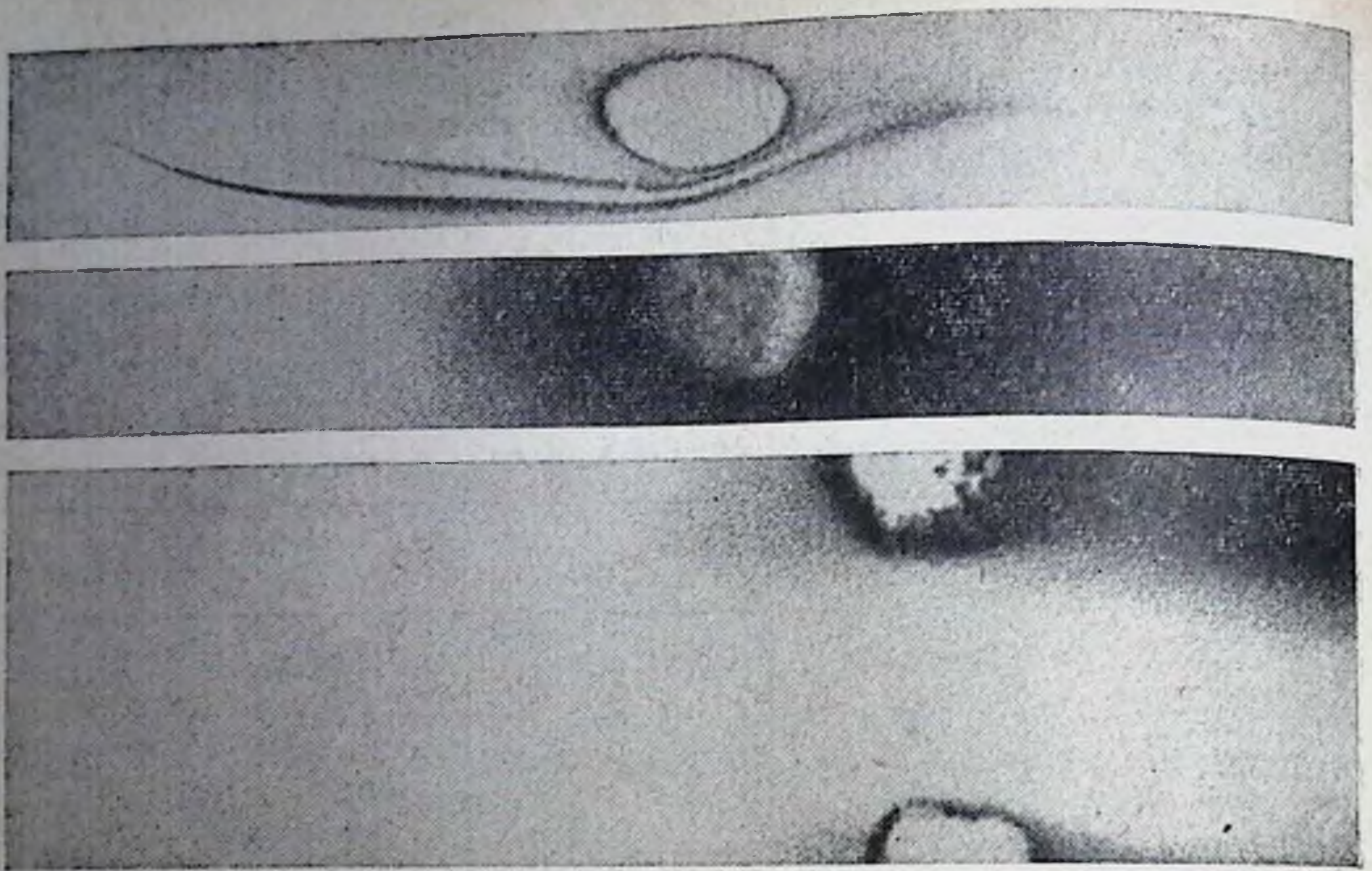


Рис. 67. Радиониммуноэлектрофорез культур селезенки цыплят с агаммаглобулинемией, без фабрициевой сумки.

против легких цепей и поливалентными антителами против тяжелых цепей, а также контроль со специфически блокированными антисыворотками. Первые строчки таблицы показывают, что этот опыт был поставлен в условиях мечения В-клеток, т. е. при кратковременной экспозиции ауторадиограмм, а именно: тимус не содержит метки, но в селезенке обнаружено около 46% меченых клеток.

Опухолевые клетки, использованные для этой работы, взяты не из ткани тимусных опухолей *in vivo*, а представляют собой линию полученную Haggis *in vitro* от одной клетки, непрерывно выращивавшейся в тканевой культуре. Обе линии тимом полностью убиваются анти- θ -сыворотками. В линии WENI-22 также большинство клеток реагирует с мечеными антисыворотками к легким и к тяжелым цепям, однако этого не наблюдается в линии WENI-105. Именно линия WENI-105 синтезировала легкие цепи. По-видимому, линия WENI-22, синтезирующая IgM, имеет на клеточной поверхности концентрацию IgM, сходную с В-клетками. Мы доказали уже, что эта линия несет рецептор комплексов антиген—антитело и в опытах с ингибицией миеломными белками установили, что специфичность этого рецептора на этой линии клеток точно такая же, как и специфичность В-клеток. В данном случае мы можем предположить два объяснения своих результатов. Во-первых, что это линия типичных В-клеток, синтезирующая IgM и удерживающая его на клеточной мембране, но поскольку этот клон присутствовал в тимусе, по крайней мере в момент индукции опухоли, в нем проявился также ген θ и, следовательно, клетки положительны как в отношении θ , так и IgM.

Другое объяснение состоит в том, что этот клон является типичными Т-клетками, но IgM, находящийся на клеточной поверхности, обладает антигаммаглобулиновой специфичностью. Это объяснило бы, почему линия образует розетки с бараньими эритроцитами, покрытыми иммуноглобулином.

Пока линия WENI-22 полностью еще не изучена. Таким образом, наиболее убедительно о присутствии иммуноглобулина в Т-клетках свидетельствует линия WENI-105, θ -положительная, клонируемая в культуре и синтезирующая белок, который в радиоиммуноэлектрофорезе подобен легкой цепи или компоненту легкой цепи.

На рис. 67 показан такой же результат, полученный с нормальной популяцией клеток, так как, возможно, результаты, полученные по проявлению иммуноглобулинового гена в злокачественных клетках, нельзя переносить на нормальные клетки. На нижних гелях мы видим слабую, но все же заметно меченую линию. Эти гели взяты от культур селезенки, бурсаэктомированных агаммаглобулинемических кур. У этих кур В-клеток нет, как можно убедиться по отсутствию связывания меченых антиглобулинов. Если представить себе, что небольшое количество В-клеток все же осталось, то у этих кур следовало бы обнаружить небольшую степень синтеза интактного IgM, однако мы видим дифференциальное мечение анодного конца пути IgG, указывающее на синтез свободных легких цепей. На верхнем геле показаны нормальный синтез IgM и IgG в контрольной селезенке кур того же возраста.

ТАБЛИЦА 85

Подавление антииммуноглобулиновой сывороткой антигенсвязывающих клеток (АСК) тимуса

Предварительная обработка антисывороткой	% подавления образования АСК ^а			
	Мышь		Человек	
Анти- χ	73; 100; 100	(91%)	41; 46; 53; 61; 66	(53%)
Анти- λ	НТ		40	(40%)
Анти- μ	86; 89; 100	(92%)	80; 88; 88; 99; 100	(91%)
Анти- α				
Анти- γ_1 ^б	0; 0; 0	(0%)	0; 11	(5%)
Анти- γ_2	0; 0	(0%)	0; 0; 0; 0; 8; 10	(3%)

^а % подавления по отношению к контрольным клеткам, не обработанным антисывороткой. Каждое значение для отдельной суспензии клеток тимуса со средним значением в скобках.

^б Антисыворотка для человека, реагирующая со всеми γ -классами.
НТ — не тестировано.

В табл. 85 приведены данные о связывающих антиген клетках в тимусе. В этих исследованиях, проведенных вместе с Dwyer, применялись тимусы мышей и человека (новорожденных и эмбрионов). В обоих случаях мы нашли клетки, связывающие антиген. Выявление этих клеток, связывающих антиген, может быть полностью подавлено предварительной обработкой клеток как человека, так и мыши антисывороткой против легких цепей или антисывороткой против μ -цепей. Таким образом, мы приходим к выводу, что в тимусе присутствуют антиген и несущий иммуноглобулин клетки, но в данном случае у нас нет прямых доказательств, что это Т-клетки. Возможно, это небольшая популяция В-клеток, имеющая цитофильно связанный IgM.

Wepasegraf. Хочет ли Wagner сказать, что любая разновидность антииммуноглобулиновой сыворотки эффективна?

Wagner. Все исследованные нами антииммуноглобулиновые сыворотки против легких цепей подавляют связывание антигена. На основании этого детального исследования Т-клеток мы приходим к выводу, что на поверхности Т-клеток имеется какой-то компонент иммуноглобулина. Основной

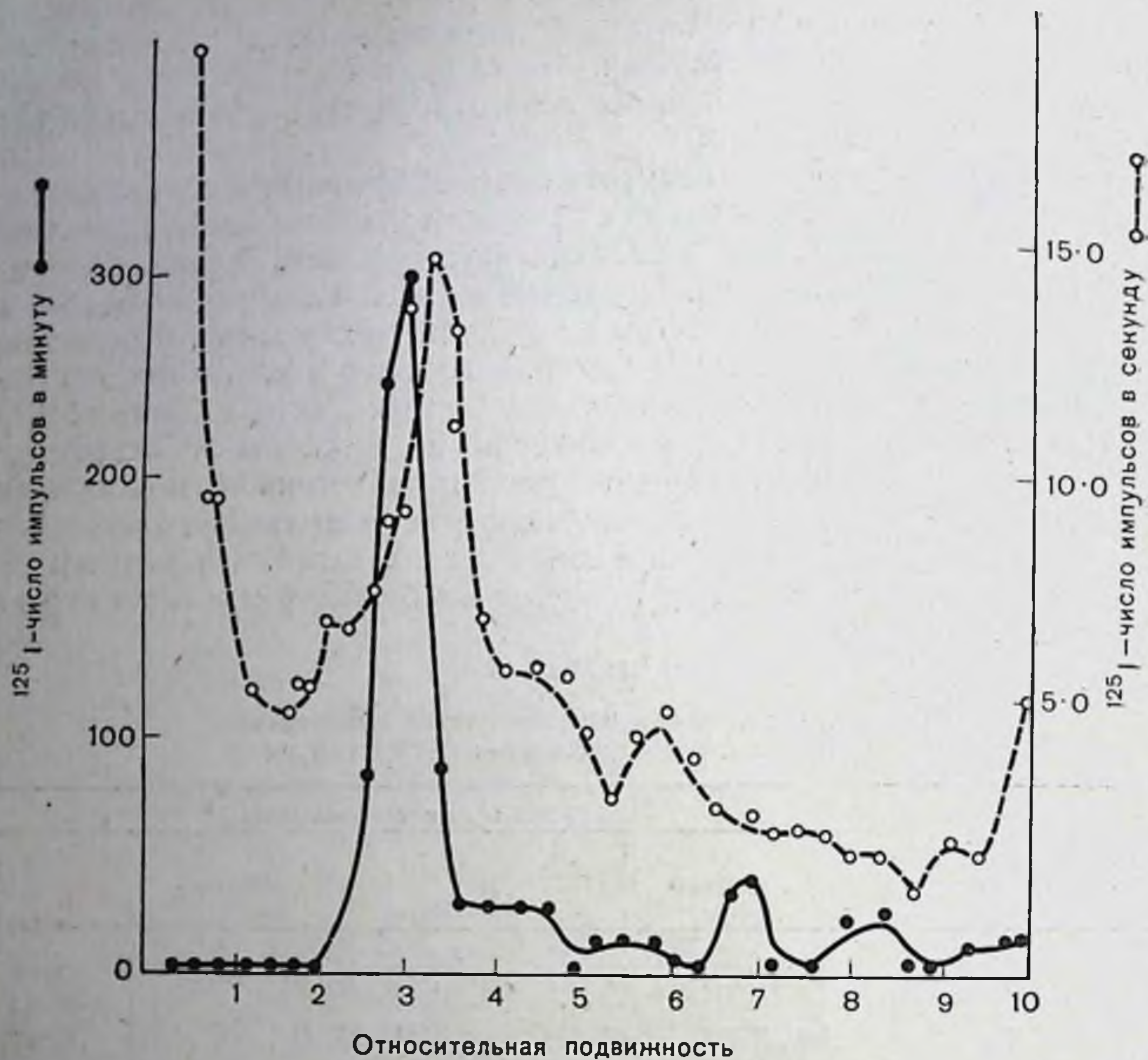


Рис. 68. Электрофорез в акриламидном геле в кислой моче­вине с поверхности радио­йодированных активиро­ванных Т-клеток. Темные кружочки—образцы специфически копре­ципитированного Ig Т-клеток (число импульсов в минуту), светлые кружочки (пунктир­ная линия) — образцы мышиного ^{125}I , меченного IgG, копреципитированного в тех же условиях (число импульсов в секунду).

вопрос, связанный с нашими результатами, почему лишь некоторые анти­иммуноглобулиновые сыворотки дают эффект?

Можно предположительно объяснить это различиями качества сыворо­ток. Возможно, что такой эффект дают только антисыворотки с активностью против вариабельной области. Можно также предположить, что существует особый ген вариабельной области, проявляющийся только в Т-клетках, но его продукт реагирует с некоторыми антисыворотками против V-области¹.

¹ Для того чтобы получить полные данные, редакторы предложили Wagner описать работу его коллег: Marchalonis, Cone, Atwell и Sprent, которые также убедительно под­держивают предположение, что Т-клетки имеют поверхностный иммуноглобулин. Более того, они прямо выделили и составили частичную характеристику поверхностного им­муноглобулина, получив указания на то, что эта молекула состоит из легких цепей и тяжелых цепей типа μ . Т-клетки мышей СВА сенсibilizировались к антигенам гисто­совместимости BALB/c или C57BL путем инъекций тимусных клеток СВА летально облученным гибридам (СВА \times BALB/c) F_1 или (СВА \times C57BL). Лимфоциты грудного протока, взятые от реципиентов на 4-й день после восстановления (СВА-Т-ЛГП), сос­тояли на 90—100% из θ -положительных клеток СВА. Активированные Т-клетки под­вергнуты поверхностному мечению ^{125}I при помощи лактопероксидазы (Marchalonis, Cone, Santer. "Biochem. J.", 1971, v. 124, p. 921). Был получен растворимый белок кле­точной поверхности (Cone, Marchalonis, Rolley. "J. Exp. Med.", 1971, v. 134, p. 1373) и,

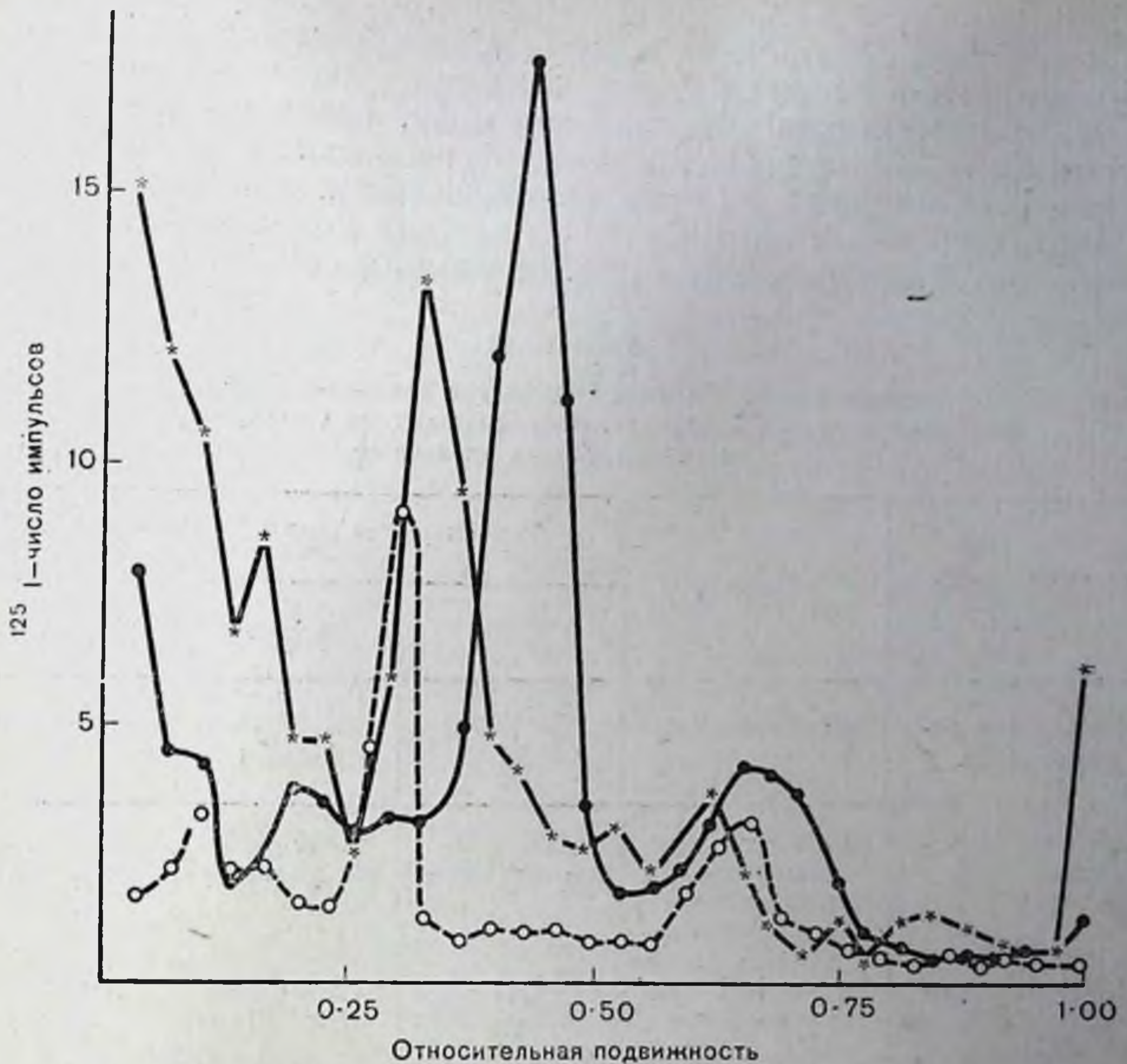


Рис. 69. Ig клеточной поверхности, показанный на рис. 68 после редукции и восстановления. Звездочками указаны данные, полученные при изучении Ig активированных Т-клеток (число имп/с $\times 10^{-2}$), темные кружочки — копреципитированный IgG в контроле (число имп/с $\times 10^{-1}$). Светлые кружочки (пунктирная линия) — копреципитированный стандартный IgM (число имп/с $\times 10^{-1}$). Относительная подвижность стандартных цепей: легкие — 0,55—0,75; γ — 0,40—0,48; μ — 0,27 — 0,33.

количество высокомолекулярного материала определялось путем гельфильтрации на сефадексе G-25; 8% этого высокомолекулярного белка специфически преципитировалось кроличьей антисывороткой, активной к легким цепям и μ -цепям мышинного γ M-иммуноглобулина (Marchalonis, Cone, Atwell. "J. Exp. Med.", 1972, v. 135, p. 956). Число импульсов, меченных ^{125}I поверхностных белков, преципитированных антииммуноглобулином, было в 6—10 раз больше, чем радиоактивность, преципитированная нормальной кроличьей сывороткой, и в 4—7 больше, чем радиоактивность, преципитированная комплексом гемоцианина с антигемоцианином или БСА с анти-БСА. Преципитированный белок клеточной поверхности растворялся в 9M мочевины, 10% уксусной кислоте и подвергался электрофорезу на полиакриламидном геле в кислой мочевины.

Как показано на рис. 68, найден только один компонент (жирная линия). Он мигрировал несколько медленнее, чем пик мышинного очищенного γ G-иммуноглобулина, который преципитировался таким же образом (пунктирная линия). Анализ этого компонента с помощью гельфильтрации показал молекулярную массу около 180 000 дальтон. Специфически преципитированный иммуноглобулин клеточной поверхности был восстановлен, алкилирован и подвергнут дисковому электрофорезу в условиях, в которых разделяются полипептидные цепи (рис. 69). В качестве контроля, чтобы определить позицию легких цепей (RF 0,5—0,75), γ -цепей (RF 0,40—0,48) и μ -цепей (RF 0,27—0,33), были использованы преципитированные, восстановленные и алкилированные γ G (линия между черными кружочками) и γ M (линия пунктирная между белыми кружочками). Поверхностный иммуноглобулин от активированных Т-клеток (линия между звездочками) содержал легкие цепи и тяжелые цепи, подобные μ -цепям по подвижности в геле.

Можно было специфически вызвать деление более чем 20% Т-клеток грудного протока мышей СВА путем контакта с антигенами гистосовместимости, использованными в процессе активации, и можно было определить связывающую специфичность иммуноглобулина клеточной поверхности. Растворимый, меченный ^{125}I белок клеточной поверхности был получен и подвергнут инкубации при 4°C с 10^7 аллогенных или сингенных тимусных клеток. Результаты приведены в табл. 86. Меченый белок от Т-клеток СВА,

ТАБЛИЦА 86

Специфичность меченных ^{125}I белков клеточной мембраны лимфоцитов грудного протока, происходящих из тимуса (Т. ЛГП) для активирующих антигенов¹

Белки клеточной мембраны	Обработка	Радиоактивность (имп/мин), связывающаяся с клетками тимуса		
		C57BL	BALB/c	СВА
BALB/c-активированные СВА Т. ЛГП	Без обработки	7900 ± 2500 $P < 0,05$	17180 ± 4700 $< 0,01$	3730 ± 550
BALB/c-активированные СВА Т. ЛГП	Совместная преципитация с антисывороткой против иммуноглобулинов	1300 ± 300 (не достоверно)	1800 ± 400 (не достоверно)	1400 ± 200 (не достоверно)
BALB/c-активированные СВА Т. ЛГП	Совместная преципитация с НКС	НТ	12200 ± 2400 $P < 0,01$	2400 ± 800
C57BL-активированные СВА Т. ЛГП	Без обработки	1544 ± 252 $P < 0,01$	630 ± 30 $P < 0,001$	416 ± 35
C57BL-активированные СВА Т. ЛГП	Совместная преципитация с антисывороткой против иммуноглобулинов	46 ± 30 (не достоверно)	107 ± 97 (не достоверно)	33 ± 20
C57BL-активированные СВА Т. ЛГП	Совместная преципитация с НКС	900 ± 100 $P < 0,001$	240 ± 10 (не достоверно)	180 ± 40

¹Значение р, данное здесь, представляет собой сравнение зафиксированного числа импульсов, связывающихся с клетками, с контролем СВА. t-тест Стьюдента, модифицированный для малых образцов, использован при подсчете. Для BALB/c-активированных Т. ЛГП значение р при сравнении BALB/c с C57BL было $< 0,05$. Для C57BL-активированных Т. ЛГП р при сравнении C57BL с BALB/c $< 0,001$.

Популяции Т. ЛГП, активированных к Н-2 антигенам, получили по методу Sprent и Miller ("Nature. New Biol.", 1971, V. 234, p. 195). Трехмесячным мышам (СВА×C57BL) F₁ или (СВА×BALB/c) F₁ вводили внутривенно 2×10^6 клеток тимуса СВА, и в течение 2 ч они получали 750 Р тотального облучения. Через 4 дня грудные протоки этих мышей были канюлированы и в течение первых 12—16 ч дренирования была собрана лимфа.

95—100% клеток грудного протока, собранных таким образом, являлись клетками тимусного происхождения донора. Такие препараты содержат менее чем 0,3% В-лимфоцитов. Клетки тимуса СВА, активированные Н-2 антигенами BALB/c, называются BALB/c-активированными СВА Т. ЛГП; клетки тимуса СВА, активированные Н-2 антигенами C57BL, называются C57BL-активированными СВА Т. ЛГП.

активированных к антигенам C57BL или BALB/c, обладал специфичностью связывания. Эта специфичность связывания полностью утрачивалась при преципитации с антииммуноглобулином, однако обработка нормальной кроличьей сывороткой не давала эффекта. Наблюдалась перекрестная реакция

между BALB/c и C57BL, это соответствует тому обстоятельству, что данные линии имеют некоторые общие антигены H-2. Мы предположили возможность того, что обнаруженный иммуноглобулин объяснялся примесью следов В-клеток. Однако эта возможность была маловероятной, так как примененные нами методы дают возможность выделить сопоставимое количество иммуноглобулина от Т-клеток и В-клеток. Кроме того, если даже Т-клетки содержали значительно меньше поверхностных молекул иммуноглобулина, чем В-клетки, все же маловероятно, что этот результат объясняется примесью В-клеток, так как при такой низкой примеси В-клеток (менее 0,3%, Basten, Miller, Sprent, Pye. «J. Exp. Med.», 1972, v 135, p. 610) все В-клетки должны были реагировать на использованные антигены и, кроме того, эти клетки должны были иметь примерно в 100 раз больше поверхностного иммуноглобулина, чем типичные В-клетки. Аналогичные результаты получены с Т-клетками, активированными к белку и эритроцитарным антигенам.

Wenacerraf. Если я правильно понял Wagner, то у него имеются две группы наблюдений — одна из них получена почти с любой антииммуноглобулиновой сывороткой. В основном эти данные касаются клеток, синтезирующих иммуноглобулин. У него есть также другая группа наблюдений, предполагающих использование особых антииммуноглобулиновых сывороток для того, чтобы подавить функцию Т-клеток. Другие антисыворотки ее не подавляют.

Wagner. Уточню. Мы применяли одну стандартную сыворотку для проявления всех радиоэлектрофореграмм, и эта антисыворотка не использовалась в опытах с блокированием. Конечно, нам нужно провести больше опытов со всеми сыворотками во всевозможных условиях, прежде чем дать точный ответ на вопрос Wenacerraf.

Wenacerraf. Больше всего в области специфичности и перекрестной реактивности работал Sela. Я хотел бы спросить его мнение о том, в какой степени данные Wagner, полученные избирательными антисыворотками, можно объяснить слабой перекрестной реактивностью между антисыворотками к легким цепям и каким-то неизвестным белком на поверхности тимоцита.

Sela. В общем на вопрос Wenacerraf можно ответить, что, конечно, могут существовать два белка, вступающие в перекрестную реакцию в небольшой степени, и перекрестные реакции, о которых говорит Wenacerraf, возможны. Wagner упомянул здесь о фибробластах. Я хотел бы добавить, что их можно убить как антиколлагеновыми сыворотками, так и антителами против синтетического антигена, сходного с коллагеном. Именно это пример такой перекрестной реакции (Maosz, Fuder, Sela — неопубликованные данные). Если задаться вопросом: существует ли что-то, не являющееся иммуноглобулином и все же перекрестно реагирующее с иммуноглобулиновой системой, то, конечно, надо ответить утвердительно, пока не будет доказано обратное.

Uhr. Я хотел бы попытаться объединить эти, казалось бы, расходящиеся данные и сделать несколько замечаний. Прежде всего результаты трех самостоятельных исследований рецепторов Т-клеток, представленные на этой конференции, не столь уж расходятся. Данные Unanue и наши собственные данные, полученные в результате применения двух совершенно различных методик, полностью совпадают. Данные Wagner, по его мнению, означают, что на тимоцитах или Т-клетках имеется небольшое количество иммуноглобулина, возможно, его фрагмент. Эти три исследования резко противоречат данным Hämmerling и Rajewsky («Eur. J. Immunol.», 1971, v. 1, p. 447), не обнаруживших большой разницы между плотностью им-

муноглобулина на Т- и В-клетках при иммуноэлектронной микроскопии, и данным Magchalonis и соавт. («J. Exp. Med.», 1972, v. 135, p. 959), которые пользовались методом, очень сходным с нашим, о том, что на тимоцитах, Т- и В-клетках имеется эквивалентное количество иммуноглобулина. Кстати, результаты двух последних работ расходятся, так как Hämmerling и Rajewsky не нашли иммуноглобулина на тимоцитах.

Далее я хочу рассмотреть замечания Venesegraf. Едва ли приемлемо иметь около полудюжины антисывороток, одинаково реагирующих с α - и μ -цепями, причем только одна из них блокирует фракцию Т-клеток. Безусловно, возможно, что блокирование объясняется другими специфичностями. Какими данными мы располагаем, чтобы исключить предположение, что кроличьи антисыворотки, которые осуществляют блокирование, имеют специфичности к другим поверхностным антигенам на мышинных тимоцитах? Несомненно, некоторые кроличьи сыворотки цитотоксичны для тимоцитов. Немедленно возникает вопрос: как объяснить абсорбцию активности иммуноглобулином или белком Бенс-Джонса? Я хочу подчеркнуть, что как В-лимфоцит, так и тимоцит весьма активно выделяют многие поверхностные белки. Я упоминал, что мы не видели выделения аллоантигена Н-2, однако многие другие белки (не являющиеся иммуноглобулинами) выделяются быстро. В опытах с мышинными В-лимфоцитами относительное количество неиммуноглобулиновых белков в инкубационной среде было примерно такое же, как на поверхности клеток. Таким образом, возможно, что в сыворотке и моче присутствуют поверхностные белки, которые нелегко отделить от миеломных белков.

Wagner. Невозможно точно отличить иммуноглобулины от предполагаемого неиммуноглобулинового продукта, выделяемого клетками, который может поступить в мочу и иметь такие же молекулярные размеры, как легкие цепи. Невозможно отрицать, что антисыворотки против легких цепей содержат также антитела к этому компоненту. Однако при электрофорезе на акриламидном геле наших препаратов легких цепей появляется только одна полоса. Кроме того, меченные ^{125}I легкие цепи специфически преципитируются практически со всеми антисыворотками против легких цепей. Если бы препарат содержал примесь другого белка, то по заряду и размерам он был бы очень сходен с белком Бенс-Джонса и присутствовал в относительно низком количестве. Это предположение исключить нельзя.

Мое объяснение того, почему существует разница между антисыворотками к легким цепям, основана на наших наблюдениях с некоторыми антисыворотками к легким цепям, полученными против человеческого очищенного белка Бенс-Джонса. Я убедился, что некоторые, но не все сыворотки имеют низкую активность против V-области благодаря своей способности различать α -цепи. Я подсчитал, что количество антител против V-области составляет лишь около 1—10% всей активности антисывороток против легких цепей. Нам надо попытаться доказать, что сыворотки мышей, действующие на Т-клетки, возможно, имеют активность против V-области. Пока мы еще не осуществили такой попытки.

Председатель Rajewsky. В этой связи можно сослаться на данные Greaves. Он установил, что образование розеток Т-клетками подавляют только

¹ Поскольку этот вопрос был снова поднят, мы считаем уместным привести цитату из нашей статьи: «Следует заметить, что метод гибридных антител, использованный в этих опытах, не позволяет легко различать классы клеток, различных по плотности данного поверхностного антигена. Следовательно, наши данные не говорят против той возможности, что у Т-клеток плотность рецепторов меньше, чем у В-клеток». — П р и м. R a j e w s k y.

те анти- μ -сыворотки, которые содержат антитела против фрагмента Fd и шарнирного участка μ -цепи.

Sela. Я хотел бы спросить участников этой сессии, предпринимались ли попытки обнаружить возможные скрытые иммуноглобулиновые рецепторы при помощи таких методов, как расщепление трипсином или неуроаминидазой?

Unanue. Мы пробовали это сделать, но получили отрицательный результат, т. е. на обработанных клетках не обнаружено иммуноглобулина.

Raff. Ashman, Greaves и я самостоятельно провели аналогичные опыты, но не нашли иммуноглобулина на Т-клетках.

McDevitt. Что именно сделал Raff?

Raff. Мы установили, что обработка селезеночных или тимусных клеток трипсином и неуроаминидазой, по-видимому, не выявляет иммуноглобулина на тимусных или Т-лимфоцитах.

McDevitt. Обнаруживался ли иммуноглобулин на лимфоцитах?

Raff. Нет.

Benacerraf. Я хотел бы спросить у Wagner, считает ли он, таким образом, что активность антииммуноглобулиновых сывороток при тесте на подавление объясняется тем, что они специфичны к некоторым последовательностям κ -цепей V-области? Активность этих сывороток может быть абсорбирована κ -цепями, следовательно, они должны быть специфичны к какому-то участку V κ -цепи.

Wagner. Антисыворотки приготовлены против К-цепей, но я предполагаю, что участок V, представленный на Т-клетках, возможно, не относится к κ -цепи, а продукт V-гена вступает в антигенную перекрестную реакцию с κ -цепью.

Benacerraf. Это возможно, но предполагается, что гены V-области тяжелых цепей и гены варибельной области κ -цепи не близки друг к другу.

Wagner. Я знаю это, но у нас мало данных по антигенным перекрестным реакциям.

Benacerraf. В отношении гипотезы перекрестной реактивности, мне кажется, Wagner должен учитывать две возможности: 1) он имеет дело с V-областью κ -цепи на поверхности тимоцитов без константных областей, 2) он имеет дело с новым набором V-областей, не родственных с κ -цепью, но вступающих с ней в перекрестную реакцию.

Wagner. Согласен с Benacerraf. В основном я предпочитаю утверждать, что, возможно, существует иной V-ген в связи с исследованиями генов иммунного ответа, выявившими связывание В-клеток *in vitro* с антигенами, к которым Т-клетки ареактивны. Мы сказали бы, что эта В-клетка имеет V-ген, который ассоциируется с данным антигеном. Но если Т-клетка иная (ареактивная), то мы полагаем, что, возможно, Т-клетка имеет другой V-ген, а не тот же, что кодирует κ -цепь.

Bodmer. В этой технически сложной области я человек совершенно посторонний, поэтому я хотел бы задать вопрос: полностью ли исключено, что эти сыворотки содержат антитела не к белкам, а к полисахаридным компонентам? Более или менее ясно, что естественные антитела, содержащиеся в сыворотке всех нормальных кроликов, которые реагируют с человеческими клетками, направлены против полисахаридных компонентов. Некоторые предварительные исследования, проведенные нами, позволяют думать, что их можно специфически подавлять полисахаридными боковыми цепями человеческого IgM.

Wagner. Если на использованных, очищенных легких цепях имеется полисахарид, то это предположение не исключено.

Simonsen. Меня, конечно, весьма заинтересовал, но несколько смутил тот факт, что Wagner смог нейтрализовать РТПХ, в частности у кур, при помощи антител против легких цепей, хотя лишь одна из многих сывороток дала эффект. Как известно, Wagner в нашей работе («Transplant. Rev.», 1972, v. 10, p. 36) удалось нейтрализовать РТПХ сыворотками со специфичностью против компонентов мембран в высоких разведениях. Это вполне можно было бы объяснить примесью антител против легких цепей в пропорции, скажем, 1:10 000 частей. Очень трудно исключить такую примесь. Следовательно, меня смущает в опытах Wagner только то, что он не смог абсорбировать эффект блокирования тимусными клетками, поэтому я хочу спросить его, применял ли он неразведенную сыворотку, когда получил подавление этой единственной сывороткой? Наконец, исследовал ли Wagner кровь, взятую до иммунизации у того же кролика?

Wagner. Клетки инкубируются с концентрациями сыворотки около 20—30%. Антисыворотка была приготовлена против очищенных куриных легких цепей иммуноглобулинов, полученных высаливанием и хроматографией на колонке в сыворотке нормальных кур. Тот же препарат легких цепей был использован для блокирования антисыворотки. Мы не ставили опытов с сывороткой этого кролика, взятой до иммунизации. Я признаю, что многие кроличьи сыворотки обладают цитотоксическим эффектом, однако эта активность в кроличьей сыворотке может меняться со временем, поэтому мы не считаем, что кровь, взятая до иммунизации, является лучшим контролем. Я полагаю, что единственный контроль — это тот же препарат антисыворотки, которым мы пользуемся, заблокированный абсорбцией очищенным иммуноглобулином.

Simonsen. Да, это так, однако блокирующий эффект, конечно, вызывает сомнение, если Wagner допускает, что исходный препарат легких цепей содержал примесь компонентов мембран.

Wagner. Эту возможность нельзя полностью исключить, если существует такой компонент мембран, который при электрофорезе мигрирует таким же образом, как легкие цепи, и имеет такие же размеры молекул.

Uhr. Ранее я хотел упомянуть, что иммуноглобулин, выделяемый В-клеткой, прикреплен к фрагменту мембраны. Это доказывается тем, что меченый липид нековалентно связан с выделенным иммуноглобулином и что анализ секретов в градиенте плотности показывает, что 70% выделенных иммуноглобулиновых молекул соответствуют липопротейну высокой плотности. Если секреты предварительно обрабатываются детергентом, то весь выделенный иммуноглобулин имеет плотность белка. Эти наблюдения, возможно, имеют отношение к опытам с абсорбцией белками Бенс-Джонса и другими миеломными белками.

Van Rood. Важно отметить, в связи с этой дискуссией, что антигены HL-A обнаружены в нормальной сыворотке, хотя и в малых количествах. Я не могу представить себе все опыты, о которых мы слышали, однако можно допустить, что кролики Wagner вырабатывали анти-Н-антитела против этого небольшого количества Н-антигена, содержащегося в нормальной сыворотке.

Wagner. Я ответил бы то же самое, что и Simonsen, но van Rood напомнил нам о другом возможном объяснении. Я признаю, что оно возможно. Надо поставить соответствующие опыты и проверить это.

Председатель Rajewsky. Теперь мы перейдем к общей проблеме рецепторов Т-клеток, в частности, я считаю, что проблему о наличии или отсутствии иммуноглобулина на Т-клетках, которой мы занимались, следует по-

пытаться представить себе в свете других исследований, выявивших интересные особенности распознавания Т-клетками.

Наряду со значительными трудностями, которые встречаются при попытках обнаружить Т-клетки, связывающие антиген, я хочу упомянуть наблюдения Wigzell, подтвержденные нами, а именно, что хелперные Т-клетки в отличие от В-клеток проходят через колонки, покрытые антигеном. Это означает, что рецепторы Т-клеток должны отличаться каким-то образом от рецепторов В-клеток, например, они могут иметь значительно меньшую плотность, чем рецепторы В-клеток, или же они легче сбрасываются. Возможно, именно поэтому многие исследователи встретились с трудностями при попытках обнаружить иммуноглобулин. Raff расскажет нам об этой общей проблеме.

Raff. Мне было бы очень неприятно, если бы гипотеза об «иммуноглобулиновых рецепторах на Т-клетках» погибла бы на этой сессии без попыток ее защиты. Я могу сослаться на четыре вида исследований:

1. Uhr только что подробно рассматривал опыты с йодированием при помощи лактопероксидазы; ясно, что пока мы не можем согласовать его результаты с данными Marghalonis. Несомненно, опыты Vitter и Uhr являются наиболее убедительными опытами отрицательного порядка, говорящими о том, что невозможность обнаружить иммуноглобулин на Т-клетках не может быть объяснена только погружением иммуноглобулиновых детерминант или сбрасыванием иммуноглобулиновых молекул с мембраны.

2. С помощью прямых методов трансформации лимфоцитов под действием антииммуноглобулиновой сыворотки или мечения лимфоцитов различными мечеными антителами к иммуноглобулинам в общем не удалось обнаружить иммуноглобулин на Т-клетках (как только что заметил Uppae), за немногими исключениями. Возможно, из них наиболее интересны работы Hämmerling и Rajewsky. Их поразительные результаты трудно объяснить, так как в их работе IgM содержали практически все Т-клетки, а не только несколько сотен молекул.

3. Опыты с подавлением функции Т-клеток особенно интересны, так как, видимо, намечается какая-то закономерность. Попытки подавить хелперную функцию Т-клеток антисыворотками к легким цепям и антисыворотками против μ обычно были удачны. Теперь к ним относятся тесты на хелперные функции как *in vivo*, так и *in vitro*, и, насколько мне известно, в литературе нет отрицательных результатов. С другой стороны, попытки подавить ответы Т-клеток на антигены тканевой совместимости антииммуноглобулиновыми сыворотками обычно были безуспешны. Я уверен, Waгner согласится с тем, что эффект тех немногих антииммуноглобулиновых сывороток, которые подавляют РТПХ, вряд ли объясняется пространственными помехами «расознавания антигена», так как кругооборот рецепторов, несомненно, быстрый и, очевидно, они могут регенерировать для ответа на аллоантигены адаптивного хозяина. Подавление скорее связано с опсонизацией или измененной миграцией введенных клеток и никак не отражает характера рецептора, взаимодействующего с аллоантигенами. Все попытки подавить опосредованное Т-клетками умерщвление аллогенных клеток мишеней *in vitro* оказались неудачными. Большинство попыток подавить реакцию в СКЛ также было неудачно. Greaves и Roitt смогли подавить СКЛ человеческих лимфоцитов антисывороткой к легким цепям. Но недавно Roitt, пользуясь различными антисыворотками к легким цепям, не смог воспроизвести эти наблюдения. Возможно, наступило время отказаться от мысли, что распознавание Т-клетками антигенов гистосовместимости связано с иммуноглобулиновыми рецепторами.

4. С другой стороны, из исследования связывания антигена Т-клетками можно сделать два важных вывода. Во-первых, как отмечает Rajewsky, очень трудно обнаружить Т-клетки, связывающие антиген. Таким образом, независимо от химической природы Т-клеточного рецептора, в этом отношении существует важная разница между Т- и В-клетками, которая пока не объяснена. Во-вторых, создается впечатление, что Т-клетки «предпочитают» видеть антиген на поверхности живых клеток. Так, было доказано, что Т-клетки специфически связываются с поверхностью аллогенных клеток-мишеней, и при помощи образования розеток легче обнаружить Т-клетки, связывающие антиген, чем с помощью других методов, в которых используется меченый растворимый антиген. Возможно, что *in vivo* Т-клетки «распознают» антигены преимущественно или исключительно на поверхности макрофагов или В-клеток. Даже в системах образования розеток ясно, что розетки Т-клеток крайне неустойчивы, и если не принять специальные меры предосторожности, они распадаются и их невозможно обнаружить. Почти несомненно этим объясняются длительные споры о том, существуют ли действительно розеткообразующие Т-клетки. Недавно Ashman и я смогли окончательно доказать существование розеткообразующих Т-клеток (Т-РОК) при помощи анти- θ -сыворотки, меченной флюоресцентом, которая была полностью специфична для θ -аллоантигена и для Т-клеток в тестах с иммунофлюоресценцией. Таким образом, существование Т-РОК уже не должно вызывать споров. Я считаю многие опыты, показывающие, что Т-РОК подавляются антииммуноглобулиновыми сыворотками, весьма убедительными благодаря строгому контролю специфичности антииммуноглобулиновых сывороток в исследованиях Greaves и Hogg. Unanue не смог подавить функцию клеток, связывающих гемоцианин в тимусе антииммуноглобулиновыми сыворотками, другие исследователи подавляли антиген-связывающие тимусные клетки, но в их работах контроль специфичности антииммуноглобулиновых сывороток оставляет желать лучшего. Может быть, нам не следует полностью отказаться от теории о существовании Т-клеточного иммуноглобулина.

Возможно, например, что Т-клетки имеют две системы распознавания: одна из антигенов гистосовместимости и другая для распознавания других типов антигена. Это предположение представляется логичным, так как беспозвоночные животные, видимо, могут распознать «инородность» (и, очевидно, обладают в какой-то степени краткосрочной иммунологической памятью и специфичностью), но не вырабатывают иммуноглобулины. Почему такая система распознавания могла бы быть утрачена в процессе эволюции? Весьма интересно предположение, что эта система состоит из рецепторов, закодированных генами главной системы гистосовместимости. Это предположение соответствует тому факту, что анти-Н-сыворотки могут подавлять реакции в СКЛ. С другой стороны, принять эту гипотезу мешает тот факт, что цитотоксичность Т-клеток против аллогенных клеток-мишеней не подавляется такими сыворотками: Элегантное исследование Shevach, Green и Paul, с которым нас познакомил ранее Green, позволяет думать, что, возможно, эта «примитивная» система распознавания распознает другие антигены, а не антигены гистосовместимости. Вторая система распознавания Т-клеток, по-видимому, может быть иммуноглобулиновой, что объясняло бы наблюдения Schlosman и Rajewsky, согласно которым Т-клетки могут различать разные антигены в той же степени, что и В-клетки и растворимые антитела. Это объяснило бы также возможность подавления хелперной функции Т-клеток и связывания антигена антииммуноглобулиновыми сыворотками.

Simonsen. В принципе я не возражаю против мысли Raff о существовании двух систем распознавания у Т-клеток; одной для образования розеток и хелперной функции, другой для распознавания трансплантационных антигенов. Однако я не считаю это весьма вероятным.

Если принять за факт данные Uhr и Upanue, то, действительно, трудно себе представить, как иммуноглобулиновые рецепторы могли бы объяснить хелперную функцию или образование розеток. Следовательно, я хотел бы предложить вам другое объяснение этих функций Т-клеток, а именно, что в результате какого-то специфического пассивного механизма Т-клетки приобретают рецепторы IgM. Иными словами, я полагаю, что они имеют собственный Т-клеточный рецептор, не состоящий из иммуноглобулина, но все же способный связывать некоторое количество антигена. После того как этот антиген связан соседними В-клетками, продуцирующими IgM, этот иммуноглобулин образует второй слой сэндвича. Таким образом, мы можем представить себе Т-клетку со специфическим IgM, хотя и не выработанным этой клеткой. Это предположение представляется мне особенно вероятным в отношении образования розеток, так как согласно нашим и другим наблюдениям клетки бурсаэктомированных кур не образуют розеток. Указанный опыт говорит о том, что у кур образование розеток полностью зависит от В-клеток.

McDevitt. Меня особенно заинтересовали слова Raff о неустойчивости розеток. В человеческой периферической крови содержится большое количество розеткообразующих клеток, активных только по отношению к бараньим эритроцитам. Их количество зависит от температуры и от условий инкубации и составляет от 4 до 40% всех лимфоцитов периферической крови! Вряд ли кто-нибудь будет утверждать, что все они специфичны к бараньим эритроцитам.

Я хочу напомнить вам, что они образуют розетки только с бараньими эритроцитами и, по данным Coombs, не подавляются антииммуноглобулиновыми антисыворотками, особенно если эти сыворотки вначале абсорбированы человеческими клетками до теста на образование розеток. Мне кажется, может быть, многие розетки, которые отличаются неустойчивостью и образование которых оказалось трудно воспроизвести в других лабораториях, подобны процессу, происходящему у человека, т. е. образованию розеток в результате неиммунологического механизма.

Raff. Нет, мне кажется, что эту возможность можно исключить, так как у человека, как заметил McDevitt, нельзя подавить розетки антииммуноглобулином, а опыты на мышах позволяют думать, что РОК по большей части специфичны. Так, Aschman установил, что при иммунизации мышей бараньими и голубиными эритроцитами менее 1 на 200 Т-РОК связывает оба типа эритроцитов. Это еще не снимает возражений Simonsen, которые, по моему мнению, совершенно справедливы. Если, как он предполагает, антиген связывается вначале, а затем связываются специфические антитела, то не должно быть клеток с двойным связыванием.

Biozzi. Я хотел бы упомянуть некоторые данные, полученные недавно Bach в Париже, которые указывают на тимусное происхождение розеткообразующих клеток у мышей. Тимэктомированные и облученные мыши СВА/Н были восстановлены костным мозгом СВА/Н и тимусными клетками СВА/Н T_6-T_6 . Через три дня после иммунизации голубиными эритроцитами все розетки были тимусного происхождения, как доказывало наличие хромосом с транслокацией T_6-T_6 . С другой стороны, пользуясь соответствующим методом, мы доказали, что подавляющее большинство РОК можно подавить гетерологичной антисывороткой против мышинного иммуноглобули-

на (анти-Fab). Эти данные соответствуют мнению, что антигенные рецепторы на Т-лимфоцитах могут быть иммуноглобулинами.

Wagner. По мнению Raff, самая простая гипотеза состоит в том, что существуют два совершенно различных механизма, однако, мне кажется, можно предложить более простой механизм, а именно наличие двух типов Т-клеток. Один тип участвует преимущественно в функциях цитотоксического характера при ГЧЗТ и отторжении трансплантата, а другой тип Т-клеток выполняет хелперные функции для В-клеток. Таким образом, возможно, что различие между ними основано на дифференциальном проявлении иммуноглобулиновых генов, которые тем не менее с точки зрения эволюции родственны между собой.

Я хочу спросить Raff: хотя есть много данных о существовании Т-клеточных розеток с ксеногенными эритроцитами, имеются также исследования, в которых аналогичные Т-клеточные розетки были направлены против аллогенных эритроцитов. Как согласовать эти наблюдения со схемой, предполагающей иммуноглобулиновый и неиммуноглобулиновый рецептор Т-клеток?

Raff. Я думаю, что было бы ошибочно рассматривать эту проблему исключительно с точки зрения розеток и бараньих эритроцитов, так как, несомненно, неустойчивость Т-клеточных розеток отражает просто неустойчивость Т-клеток, связывающих антиген вообще.

Председатель Rajewsky. Мы ограничены временем и я предложу заняться вопросом о том, существуют ли различия специфичности рецепторов Т- и В-клеток.

Vach. Я хотел бы начать обсуждение этого вопроса, сославшись на наблюдения Simonsen, который заметил, что при РТПХ до 3% клеток могут отвечать на аллогенные различия на хориоаллантоисной мембране. В дальнейшем Wilson и наша группа установили, что клетки, реагирующие в СКЛ, также характеризуются этим очень большим числом первоначально отвечающих единиц, несмотря на то, что, как мы полагаем, надо иметь возможность распознавать очень большое количество молекул или антигенов.

Я хотел бы доказать, что надо учитывать не только ответ в алогенной СКЛ, но и ответ в ксеногенной СКЛ. Из табл. 87 ясно, что мышинные клетки не только отвечают на аллогенные мышинные клетки (в контроле радиоактив-

ТАБЛИЦА 87

Ксеногенные ответы в СКЛ

Отвечающие клетки	Стимулирующие клетки	Реактивность (выражен как среднее количество имп/мин)
Мышь-1	Мышь-1	1 549
То же	Мышь-2	33 902
» »	Человек-1	67 429
» »	Человек-2	19 048
» »	Кролик-1	24 348
» »	Кролик-2	41 945
» »	Собака	5 274

ТАБЛИЦА 88

Ксеногенные ответы в СКЛ

Отвечающие клетки	Стимулирующие клетки	Реактивность (выражена как среднее количество имп/мин)
Человек-1	Человек-1	1 966
То же	Человек-2	66 985
» »	Мышь-1	2 076
» »	Мышь-2	19 592
» »	Кролик-1	65 841
» »	Кролик-2	41 992
» »	Собака	18 196

ность 1549 имп/мин, а в эксперименте 33 902 имп/мин), но и на ксеногенные клетки (в контроле опять-таки радиоактивность 1549 имп/мин, а при ксеногенной стимуляции в зависимости от вида, от которого взяты стимулирующие клетки, — от 5000 до 67 000 имп/мин).

Аналогичный ответ человеческих клеток показан в табл. 88, что опять указывает на возможность выраженного ксеногенного ответа. Важный вопрос заключается в том, являются ли отвечающие клетки в СКЛ тотипотентными, как предполагает Simonsen.

Я хотел бы напомнить участникам конференции об опытах Zoschke, поставленных в моей лаборатории, подобных опытам Solmon. Он доказал, что в отношении ответа в СКЛ существует специфичность. Как видно из табл. 80, эта специфичность была доказана в опыте, когда отвечающие делящиеся клетки в активированной СКЛ были убиты 5 бромдиоксиуридином (5-БДУ) и светом. Смешанная культура АВ_m без 5-БДУ включает 4277 импульсов. Когда эта СКЛ обрабатывается 5-БДУ и светом, то отвечающие клетки можно полностью ликвидировать и тимидин практически не включается. Аналогичные результаты получены с АС_m.

ТАБЛИЦА 89

Эффект обработки 5-БДУ и светом на СКЛ

Смесь	5-БДУ	Реактивность (выражена как среднее количество имп/мин)
АВ _m	Нет	4277
»	Да	45
АВ _m	Нет	7329
»	Да	108

ТАБЛИЦА 90

Специфичность ответа в СКЛ

Начальная смесь	Вторичный стимул	Реактивность (выражена как среднее количество имп/мин)
АВ _m	А _m	214
»	В _m	511
»	В _m	2715
АВ _m	А _m	414
»	В _m	5313
»	В _m	360

Табл. 90 показывает, что если клетки А первоначально стимулировались аллогенными клетками В и отвечающие клетки убиты 5-БДУ и светом, то на последующее добавление В-клеток ответа нет. Наблюдается хороший ответ на другие аллогенные клетки С_m; с другой стороны, если клетки А вначале стимулируются С_m, затем обрабатываются 5-БДУ и светом, то вторичного ответа на С_m нет, но имеется хороший ответ на В_m. Ввиду этих данных перед нами предстают два вопроса различной сложности. Первый вопрос: что распознается?

Мне кажется, на предыдущей сессии было доказано, что распознается не просто серологически определяемый антиген тканевой совместимости, а участок между Н-2К и Н-2D у мышей, и, следовательно, мы не знаем, сколько антигенов должно распознаваться. В первую очередь я хочу подчеркнуть, что подобные решающие данные говорят лишь о том, что функциональные клетки не тотипотентны. Безусловно, возможность обширной плюрипотентности не исключена.

Serpellini. Я хотел бы привести некоторые данные о клеточном иммунном цитолизисе у человека, так как они имеют прямое отношение к роли «серологически определяемых» и «лимфоцитарно-определяемых» аллогенных раз-

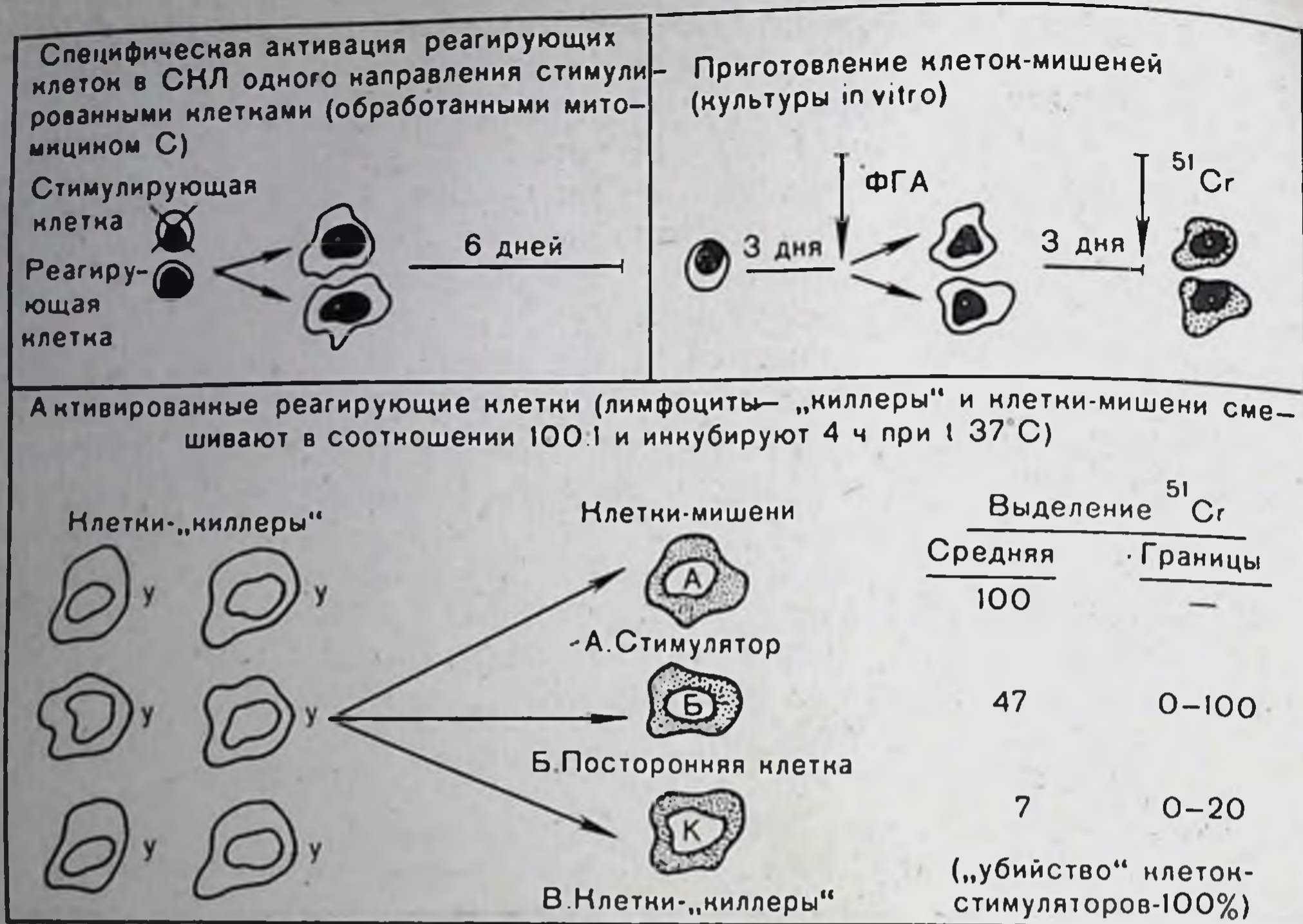


Рис. 70. Клеточная лимфотоксичность у людей.

личий или антигенов SD и LD по терминологии Bach. Известно, что лимфоциты отвечающих животных, активированные *in vitro* в односторонней СКЛ с аллогенными (обработанными митомицином С) лимфоцитами, приобретают способность разрушать соответствующие клетки-мишени. В отличие от других систем, например, активации лимфоцитов ФГА, эта эффекторная фаза клеточного иммунитета обладает значительной специфичностью к избираемым мишеням, как впервые доказали Solliday и Bach («Science», 1970, v. 70, p. 1406). Этот феномен в данном отношении близок к классической модели Cerottini и Grүнner, где, однако, активация происходит *in vivo*. Эксперименты на человеке до настоящего времени ограничиваются тем, что нормальные лимфоциты периферической крови резистентны к опосредованному клетками лизису. Однако мы знаем, что лимфобласты, полученные при стимуляции ФГА, становятся значительно более чувствительными к лизирующему действию аллоантител + комплемента, не теряя своего первоначального антигенного профиля (по крайней мере по HL-A). Эта большая чувствительность объясняется увеличением количества некоторых ферментов лизосом в премитотических клетках, которые, очевидно, могут содействовать саморазрушению после первоначального, вызванного извне, повреждения мембран. Тот же механизм, вероятно, содействует приобретению способности к лизису активированными лимфоцитами.

В этом свете мы разработали простой, но эффективный метод, изображенный на рис. 70. Эффекторные лимфоциты активируются посредством односторонней СКЛ, а панель мишеней готовится из периферической крови нормальных доноров путем деления лимфоцитов, как для СКЛ, инкубацией в питательной среде при 37°C в течение 3 дней, а затем добавления ФГА. На 6-й день трансформированные ФГА лимфобласты промываются и метятся ^{51}Cr (теперь мы предпочитаем метить их посредством включения ^{14}C тимидина в последние часы культивирования). Эффекторные клетки,

которые теперь являются бластами, полученными в СКЛ, смешиваются в отношении 50:1 с мечеными клетками-мишенями и оставляются в течение 4 ч при 37° С. Лизис клеток как обычно вычисляется в процентном выделении ^{51}Cr (Lightbody e. a. — «J. Batt. Virol. Immunol.», 1971, v. 64, p. 243; Miggiano e. a. — «Transplant. Proc.», 1972, v. 4, p. 231). В этих экспериментальных условиях активация ФГА, даже когда ФГА вновь добавляется в последней эффекторной фазе реакции, сама по себе не вызывает значительного разрушения мишеней.

Наоборот, последующая активация в аллогенной СКЛ дает результаты, приведенные на рис. 70: 1) деструкция в значительной мере специфична, так как почти без исключения максимальный лизис достигается, когда мишени и стимулирующие клетки изогенны (специфическое умерщвление). Для того чтобы облегчить сравнение, этот эффект был принят за 100. В абсолютном отношении специфическое выделение ^{51}Cr может колебаться от 20 до 90% общего выделения; 2) если мишень изогенна с клетками-киллерами, то выделение ^{51}Cr лишь незначительно превышает спонтанное выделение. Примерно у 2—5% здоровых индивидов наблюдается значительная степень аутологичного умерщвления. Это наблюдалось у одних и тех же индивидов в разные сроки, в различных опытах. Таким образом, это не техническая погрешность и данное явление заслуживает дальнейшего исследования; 3) мишени, аллогенные как с эффекторными клетками, так и со стимулирующими, обычно разрушаются в значительной степени (перекрестное умерщвление), хотя на уровне, в среднем на 50% ниже специфического умерщвления. Однако этот уровень широко колеблется от 0 до 100.

Описанный тест представляет некоторый интерес для клиники, например, для лимфоцитов больных с трансплантатами во время криза отторжения. Клетки таких больных являются киллерами донорских клеток трансплантата и не нуждаются в предварительной активации в СКЛ *in vitro*. Этот тест также весьма интересен для изучения теоретических проблем, так как он дает возможность исследовать перекрестную реактивность для клеточного иммунитета между тремя партнерами (эффектор, мишень и аллогенный стимулятор). Мы убедились, что перекрестное умерщвление в значительной мере специфично, т. е. обусловлено структурами, необходимыми для распознавания клетками-эффекторами, которые являются общими для мишени и аллогенного стимулятора (конечно, у эффекторов этих структур нет). Мы убеждены также, что основную роль играют различия, контролируемые хромосомой HL-A. Действительно, при 8 из 9 сопоставлений не было достоверной разницы по степени деструкции, когда мишенью был специфический стимулятор или сибс, идентичный по HL-A. Напротив, когда мишенью служил сибс, отличающийся по двум хромосомам HL-A, то при 8 из 9 сопоставлений спонтанное выделение ^{51}Cr было ниже, чем специфическое, и не больше, чем в опытах с генетическими неродственными мишенями ($p < 0,001$, табл. 91). Основная роль HL-A вполне понятна и соответствует тому, что известно для H-2 в мышинных моделях. Важный новый вопрос состоит в том, играют ли различия SD и LD такую же роль в эффекторной фазе, как и в фазе активации. Наши данные указывают на то, что это не так. В эффекторной фазе ЦЭЛ серологически определяемые антигены (продукты локусов LA и FOUR) более важны, чем различия, контролируемые третьим локусом (MLC) комплекса HL-A, тогда как для СКЛ справедливо противоположное. Этот вывод поддерживается данными, которые можно подытожить следующим образом.

1. Общие серологические различия HL-A (по локусу LA или FOUR), между аллогенным стимулятором и мишенью не только между сибсами,

ТАБЛИЦА 91

СКЛ и ЦЭЛ¹ между связанными и несвязанными индивидами, избранными на основании генотипа HL-A

Стимуляторы	Эффектор: Р-подобный; мишень: Р		Эффектор: Р-неподобный; мишень: Р	
	H ³ -тимидин, имп/мин	% выделения Сг	H ³ -тимидин, имп/мин	% выделения Сг
Ребенок (Р)	111 000	13,6	111 000	71,6
Отец	120 900	9,3	70 100	33,8
Мать	55 400	3,5	82 100	62,0
Р-неподобный	101 200	4,1	3 300	4,1
Р-подобный	1 200	—1,7	73 900	71,2
Генотипы HL-A				

Члены семьи	Несвязанные доноры
Отец: 2,5, 4a/3, w 18,4 b Мать: 1,8, 4b/11, w 15,4b Ребенок: 1,8, 4b/3, w18, 4b	Р-подобный 1,8, 4b/2, w 15,4b Р-неподобный 2,5, 4a/Da 22, 12,4a

¹ Для сведения к минимуму неспецифической индивидуальной вариабельности мишенью всегда был ребенок (Р). Эффекторами были донор, подобный мишени по HL-A (Р-подобный, левый столбик), и неродственный донор, HL-A неподобный (Р-неподобный, правый столбик). — «Transplan. Proc.», 1972, V. 4, p. 231.

¹ Цитотоксический эффект иммунных лимфоцитов в.

но и между неродственными индивидами значительно увеличивают лизис мишеней. Среднее перекрестное умерщвление (в процентах от специфического умерщвления) равно 72%, если мишени и стимуляторы имеют два общих антигена HL-A, но только 30%, если они не имеют общих антигенов ($p < 0,001$). Кроме того, в этих условиях случаи с высоким процентом умерщвления часто можно объяснить серологическими перекрестными реакциями по HL-A (например, 4a и 4b). Согласно тому, что мы знаем о полиморфизме комплекса HL-A, частоте кроссинговера между тремя локусами и активации в СКЛ между неродственными индивидами, идентичными по HL-A (как ранее пояснил van Rood), не следует предполагать, что среди неродственных индивидов аналогия по SD обязательно означает аналогю по LD;

2. На этой сессии Bach весьма элегантно доказал, что у мыши, как и у человека, активация в СКЛ *in vitro* обусловлена различиями, которые локализируются в комплексе H-2, но не в тех же областях, которые контролируют антигены H-2D и H-2K. Благодаря этой важной новой информации можно пересмотреть многие литературные данные, показывающие, что, когда достигнута активация, эффекторные клетки могут разрушать мишени, имеющие только общие специфичности SD со стимулятором и тот же аллель I_r, а следовательно, MLC, что и эффектор (см., например, Manuel e. a. — «Immunology», 1970, v. 18, p. 517). Лимфоциты C3H (k^k, I_r^k, S_s^k, D^k), активированные DBA/2 (d, d, d, d), дают 59% выделения ⁵¹Сг со специфической мишенью-клеткой DBA/2 и 38% с клетками-мишенями А (k, k, d, d).

3. Как доказали Cerrottini и Brünner, гуморальные антитела против факторов SD полностью подавляют ЦЭЛ. Это относится также и к настоящей системе если пользоваться $F(ab^1)_2$ вместо интактных антисывороток к HL-A. Действительно, когда применяются интактные иммуноглобулиновые молекулы, блокирование ЦЭЛ в нашей системе маскируется лизисом, обусловленным «литическим взаимодействием лимфоцитов и антител», т. е. приобретением цитолитических свойств В-лимфоцитами при взаимодействии с мишенями, покрытыми антителами, как описывают Mölleg и Perlmann. В этой последней системе бласты, трансформированные ФГА, также являются прекрасной мишенью (табл. 92). Блокирование ЦЭЛ

ТАБЛИЦА 92

Эффект анти-HL-A-антисыворотки на однонаправленную СКЛ и ЦЭЛ

Однонаправленная СКЛ				ЦЭЛ			
взаимодействующие лимфоциты		сыворотка, добавленная к культуре клеток	иммунный ответ (% включения 3H)	выделение ^{51}Cr из двух различных типов клеток-мишеней, %			
отвечающие	стимулирующие			А		В	
		имп/мин	НС	Ат	НС	Ат ²	
Б	А	НС	39 900	29	25 ³	0	20
Б	А	Ат ¹	8 800	7	—	3	—
А	Б	НС	39 600	4	3	41	79 ⁴
А	Б	Ат ²	600	0	—	0	—
В	—	—	—	4	3	2	55 ⁵

А — реципиент, получивший множественные переливания крови, в результате у него образовались «сильные» цитотоксические антитела (Ат) к Б (неродственный индивид). В — третий донор, Ат-отрицательный. НС — нормальная человеческая сыворотка. Ат, добавленные во время СКЛ (в отсутствие комплемента), снимают активацию, когда направлены против или отвечающих клеток (1), или обработанных митомцином С стимулирующих (2). В отличие от этого Ат против эффекторных клеток (3), добавленные во время эффекторной фазы ЦЭЛ, не снимают цитолизиса, в то время как антитела против мишени (4) заметно усиливают лизис. Последний эффект также получен, когда мишени взаимодействуют неактивированными лимфоцитами индивида В в присутствии Ат (5) и в отсутствие комплемента.

³ Выделение ^{51}Cr уменьшается до <5%, когда интактные Ат замещаются $F(ab^1)_2$.
Trinchieri e. a. „Histocompatibility Testing“. Munksgaard, Copenhagen, 1972.

антителами к HL-AF(ab¹)₂ мишени позволяет думать, что антигены HL-A являются чувствительными участками как для цитотоксических антител, так и для активированных лимфоцитов. Однако нельзя исключить и другие объяснения: а) сыворотки, содержащие цитотоксические антитела против антигенов SD, могут также содержать блокирующие антитела против антигенов LD, которые не распознаются при помощи современных цитотоксических тестов; мы все еще не провели соответствующих опытов с абсорбцией, как я отмечал на сессии 1-й; б) с другой стороны, пространственные помехи, создаваемые антителами против SD, могут повлиять на соседние участки LD.

4. Между СКЛ и ЦЭЛ существует еще одна разница: аллогенные сыворотки, весьма эффективные при блокировании СКЛ, когда они направлены против отвечающих клеток или против стимуляторов, не нарушают цитотоксичности, если они направлены против эффекторных клеток (табл. 92).

Если блокирование СКЛ не является неспецифическим феноменом (см. рис. 7), то эта разница, очевидно, означает, что структуры отвечающих клеток, вовлекаемые в активацию в СКЛ, не совпадают со структурами эффекторных клеток, ответственных за распознавание мишени.

На мой взгляд, нет сомнений о биологическом значении СКЛ. Однако мы продолжаем размышлять о том, какой смысл это может иметь *in vivo*. Насколько я понимаю, сильная активация *in vivo* и в последующий весьма эффективный ЦЭЛ *in vitro* может быть получена также, когда отвечающие и стимулирующие клетки различаются только по SD, но не по Iг (см., например, работу Brondz и Spegigova. — «Immunology», 1972, v. 20, p. 456). Следующие сочетания: отвечающая линия (k, k, k, k), стимулятор и мишень (k, k, d, d) дают 80% лизис. Приведенные данные позволяют думать, что различия LD не столь обязательны *in vivo* для активации лимфоцитов, как, по-видимому, в системе *in vitro*.

Я неоднократно говорил с Bach о том, что существует соблазн принять за структуры SD гаптенную группу комплексного антигена, легко вызывающую образование гуморальных антител. Напротив, LD рассматривается как носитель, особенно важный для активации клеточного иммунитета. Однако над ним часто доминируют соседние гаптенные группы в отношении образования гуморальных антител. Я предвижу возможные возражения против этой модели, а именно следующее. Носитель и гаптен топографически должны находиться в очень близком соседстве, т. е. на одной и той же молекуле или комплексе молекул. Теперь мы знаем, что продукты 4 генов HL-A находятся на самостоятельных единицах на клеточной поверхности (Bernoso e. a. — «Histocompatibility Testing», Munksgaard, Copenhagen, 1972). Это трудно объяснить, если антигены SD должны быть «сопряжены с продуктом» локуса MLC (исходя из допущения, что это единственный локус LD в комплексе HL-A). Для того чтобы объяснить самостоятельную подвижность детерминант SD (и особенно продуктов двух аллелей локуса LA, которые при частоте рекомбинаций с локусом MLC более 1% локализируются по другую сторону локуса Four), мы должны допустить, что молекулы HL-A сцеплены только с продуктами, контролируруемыми аллелем MLC, находящимся на той же, а не на гомологичной хромосоме. Иначе различные специфичности HL-A будут двигаться вместе на клеточной поверхности, так как они физически сцеплены с одним и тем же носителем. Так или иначе мне кажется важным помнить о том, что активация в СКЛ, хотя и контролируемая исключительно или преимущественно третьим локусом, тем не менее индуцирует у эффектора иммунологическую специфичность к детерминантам, контролируемым другими локусами. Можно было бы полагать, что различия MLC необходимы только для «неспецифической» депрессии дремлющего лимфоцита. Затем в распознавании участвуют другие аллогенные структуры клеточной поверхности. Однако я предпочитаю закончить свое выступление, вновь процитировав слова Bach: «Любой человек, которого не смущает СКЛ, лишен способности к ясному мышлению»¹.

¹ Eysvoogel и соавт. (Histocompatibility Testing. Munksgaard, Copenhagen, 1972) установили, что 2 субса, различных по серологическим факторам HL-A, не стимулируют клетки друг друга в СКЛ, вероятно, потому, что они являются рекомбинантами, т. е. первый субс LA^a, FOUR^a, MLC^a, а рекомбинантный субс "b, b, a". Если, однако, лимфоциты "a, a, a" активируются в СКЛ лимфоцитами b, b, b третьего субса, то они могут убивать в ЦЭЛ так же, как лимфоциты "b, b, b" или "b, b, a". Это убедительно поддерживает предложенную гипотезу о том, что в эффекторной фазе цитолиза, опосредованного клетками, распознаются антигены SD HL-A, а не LD подобно тому, как они служат мишенями лизиса, зависящего от антител + комплемент. — Прим. Серре I I p i.

Ваш. Мне кажется, что на вопросы, так интересно поставленные Serpelli, пока ответить очень трудно. Он очень четко их сформулировал, однако, может быть, стоит немного больше порассуждать о проблемах, поставленных в этой области. Я считаю важным, что одно наблюдение объяснено. Локусы LD, как мы их называем, обычно локализируются там же, где локусы Ig. Конечно, это не значит, что они одни и те же. С другой стороны, как я уже замечал, стимуляция в СКЛ ассоциируется с некоторыми различиями участка H-2D. Это наблюдение можно объяснить по-разному. Возможно, что антигены SD локуса H-2D сами по себе стимулируют в СКЛ или существуют LD-локусы, тесно сцепленные с локусом H-2D, которые обладают стимуляторным эффектом и не отделены рекомбинацией от локуса H-2D. Точно так же представляется возможным, что локусы Ig будут найдены справа от Ss—Slp. Это важно, так как таким образом осложняется интерпретация цитотоксичности, наблюдаемой при различиях только по концу H-2D основного комплекса гистосовместимости.

Хочу вернуться к вопросу, несколько раз поднимавшемуся на этой конференции, т. е. к вопросу о связях между локусами LD (выявляемыми по стимуляции в СКЛ) и выживанием трансплантатов. Я условно ставлю знак равенства между цитотоксичностью *in vitro* или тестом ЦЭЛ с эффекторной фазой реакции на гомотрансплантат. В действительности я сомневаюсь в том, что тест ЦЭЛ адекватно представляет все, вероятно разнородное, эффекторное звено этой реакции. Мы должны остановиться на трех комбинациях линий мышей, которые различаются по главной системе гистосовместимости, но серологически, по-видимому, неотличимы.

Во-первых, C57BL/6 и H(rI) различаются по спонтанной мутации в левой части MHS. Они представляются серологически идентичными при перекрестной иммунизации. Их клетки взаимно стимулируют в СКЛ и кожные трансплантаты их взаимно отторгаются. Вагбага Alter в нашей лаборатории провела самые предварительные опыты, чтобы установить, может ли быть обнаружена активность в ЦЭЛ после сенсibilизации в СКЛ в этой системе. Я должен вновь подчеркнуть, что эти результаты только предварительные. Однако она установила, что клетки убивают в реакции ЦЭЛ при наличии только этой разницы. Таким образом, мне кажется, существование этой комбинации означает, что не во всех случаях требуются антигенные различия по SD, чтобы получить ЦЭЛ, хотя специфичности мишени для ЦЭЛ могут быть иными, чем у молекул, стимулирующих в СКЛ.

Затем обратимся ко второй комбинации — комбинации AQR и B10·T(6R). У этих мышей также взаимно отторгаются кожные трансплантаты (по всей вероятности, из-за различий по MHS) и происходит взаимная активация в СКЛ. Отторжение кожных трансплантатов, на мой взгляд, еще не обязательно означает, что после активации в СКЛ будет наблюдаться активность в ЦЭЛ. По-видимому, многие различные механизмы могут привести к отторжению трансплантата, даже если тест ЦЭЛ отражает по крайней мере некоторые из них, отторжение кожных трансплантатов может наступить без фазы реакции на гомотрансплантаты, представленной ЦЭЛ. У этой комбинации линий данных по ЦЭЛ не получено.

В-третьих, наиболее поучительны комбинации B10·A(2R) и B10·A(4R). Здесь имеются различия LD только в одном направлении: 4R отвечает на 2R в СКЛ, но ответа в другом направлении нет. Эта комбинация очень интересна, так как отторжения кожных трансплантатов не происходит ни в одном направлении. Можно предположительно объяснить эти наблюдения тем, что две линии различаются по локусам LD, но не различаются по локусам, необходимым для отторжения кожных трансплантатов. Следовательно,

я предположил бы, как только что это сделал Serpellini, что эффекторная фаза ответа на гомотрансплантат, по крайней мере в некоторых случаях, как можно судить по ЦЭЛ, направлена на другие различия, а не на продукты локусов LD. Собственные исследования Serpellini, показавшего очень точную корреляцию между антигенами 4b и 4a и тестом ЦЭЛ, являются самым убедительным доказательством того, что мишенью могут быть серологически определяемые антигены (SD). Однако мы должны помнить о другом возможном объяснении, как часто обсуждали мы с Serpellini, а именно, что мишень для ЦЭЛ детерминируется генами, тесно сцепленными с локусами SD, и неравновесное сцепление ведет к корреляции. Волнующее предположение о том, что мишени для эффекторных клеток в ЦЭЛ отличаются от молекул, стимулирующих в СКЛ, обязательно предполагает, чтобы мишени были антигенами SD.

Я считаю весьма интересным и весьма вероятным, что ответ Т-клеток в СКА отражает какую-то фазу из различных реакций, объединяемых понятием реакция на гомотрансплантат. Реакция *in vivo*, которую я всегда связывал с СКЛ, — это та фаза РТПХ, которая связана с пролиферацией донорских клеток. Я полагаю, что исследование РТПХ у этих комбинаций представило бы величайший интерес.

Когда изучаемый вопрос становится достаточно сложным и интересным, то следует использовать модель, которая объяснила бы результаты. Хочу предложить такую модель. Можно представить себе популяцию Т-клеток, в которой рецепторной молекулой является продукт Ig, который отвечает на различия — LD и ведет к пролиферативному ответу. Можно предположить также механизмы, посредством которых эта популяция сама по себе может дать отторжение. Однако я бы рассматривал такую популяцию Т-клеток прежде всего как облегчающую или кооперирующую. В этом отношении эта первая популяция Т-клеток была бы аналогична хелперным Т-клеткам, облегчающим ответ В-клеток. По аналогии с этой моделью я предположил бы, что этот первый ответ не обязателен в каждом случае. Однако ответ этой популяции, по крайней мере в большинстве случаев, был бы необходимой предпосылкой для ответа второй популяции лимфоцитов. При наличии ответа популяции, отвечающей на LD, могла бы отвечать вторая популяция лимфоцитов, рецептор которой, возможно, представляет собой молекулу, подобную иммуноглобулину. Возможно, что эта вторая популяция отвечает на антигены SD или какую-либо другую подобную структуру, детерминируемую генами, тесно сцепленными с генами локусов SD. Эта вторая популяция в отдельности или вместе с популяцией, отвечающей на LD, должна дать ЦЭЛ. Я полагаю, что такую же модель можно построить, предполагая наличие только одной популяции клеток, отвечающих вначале на антигены LD, а затем SD или их эквивалент, но последняя модель, на мой взгляд, гораздо менее удовлетворительна. Предлагая эту модель, я несомненно помню о наблюдениях Cantor и Asofsky, показавших, что в некоторых случаях существует кооперация Т-клеток, а также о противоречивых данных в отношении присутствия иммуноглобулина на мембране Т-лимфоцитов. Меня убеждают описанные здесь наблюдения Uhr, но, возможно, в некоторых условиях другая популяция Т-клеток может проявить рецепторы, подобные иммуноглобулину. Если это так, то хотелось бы предположить, что вторая популяция распознает антигены SD, которые определяются с помощью антител.

Наконец, я хотел бы отметить, что Serpellini в основном базировался на данных, полученных у человека, а мои замечания основаны на опытах с мышами. Однако было бы, вероятно, лучше всего, если бы мы все учитывали,

что локусы LD у мыши, которые, видимо, локализируются между двумя локусами SD, возможно, отличаются от предполагаемого локуса у человека, находящегося вне двух локусов SD.

Председатель Rajewsky. Выступления Serpellini, а также Bach по вопросу о специфичности весьма нас порадовали, но все же необходимо рассмотреть основной вопрос, т. е. можно ли различать два набора специфичностей у Т- и В-клеток. Хотел бы попросить Schlossman выступить по этому вопросу.

Schlossman. Вопрос о том, действительно ли сильно отличается набор специфичностей у Т-клеток от специфичностей В-клеток, очень важен. В наших опытах с синтетическими ДНФ-олиголизинами специфичность Т-клеток, определяемая по индуцируемому антигеном включению тимидина, ГЧЗТ или образованию МИФ, может различать ряд весьма родственных ДНФ-олиголизинных, различающихся только по позиции гаптена и длине олиголизинных цепочек. Клетки от животных, сенсibilизированных к 9, е ДНФ-Лиз9, нелегко пролиферируют под действием близкородственных и перекрестно реагирующих антигенов. Таким образом, Т-клетка обладает замечательной способностью к распознаванию.

Если обратиться к антителам против этих пептидов, то мы видим, что антитела могут отличать один пептид от другого. По нашему мнению, весьма важен тот факт, что диапазон специфичностей Т- и В-клеток одинаков. Когда отвечающее животное реагирует на определенный ДНФ-олиголизин, то отвечают как его Т-клетки, так и В-клетки, и при этом клетки различают близкородственные антигены. С другой стороны, у неответающих животных, получивших тот же пептид вместе с тем же адьювантом, не обнаруживается специфических Т-клеток и их В-клетки также лишены способности к различению антигенов. Подобные исследования позволяют думать, что Т- и В-клетки имеют одинаковый диапазон специфичности и, возможно, идентичные системы распознавания¹.

Различия Т- и В-клеток с точки зрения специфичности, возможно, объясняются не разным распознаванием, а различными условиями, необходимыми для возникновения иммунного ответа. Специфичность Т-клеток к антигенам может быть идентична специфичности В-клеток. Они могут использовать один и тот же иммуноглобулиновый или подобный иммуноглобулину рецептор, но различаться по количеству или распределению рецепторов. Это не означает, что продукт гена Ig не участвует в распознавании антигена на другом уровне, обособленном от иной, весьма специфической «системы распознавания». Эту весьма специфическую систему распознавания Т-клеток легче всего объяснить антителоподобной молекулой, хотя сейчас оказалось трудно обнаружить антитела на поверхности Т-клеток.

Председатель Rajewsky. Наши собственные довольно обширные данные по специфичности хелперной функции полностью соответствуют наблюдениям Schlossman. Вопрос о различиях специфичности между Т- и В-клетками неоднократно ставился на этой сессии. Желает ли кто-нибудь еще выступить по этому вопросу?

Wagner. Стоит упомянуть, что группа, возглавляемая Ada, провела работу с двумя флагеллинами, которые не дают в перекрестной реакции гуморальных антител, но была обнаружена их полная перекрестная реактивность для индукции и развития ГЧЗТ. Это может означать, что *in vivo* Т-клетки распознают эти флагеллины иначе, чем В-клетки.

¹ Предлагаем читателю обратиться к выступлению Schlossman на сессии 2-й. Выводы, сделанные им там, очевидно, относятся и к замечаниям, которые приводятся здесь. — П р и м. р е д.

Я хотел бы сделать еще одно замечание. Если на Т-клетке проявляется только часть всех иммуноглобулиновых генов, например только продукт вариабельной области, то можно было бы предположить иную степень специфичности связывания, чем при связывании, опосредованном тяжелой и легкой цепями полной молекулы.

Sela. Подобно данным Ada, я могу упомянуть еще 2 случая перекрестной реакции в клеточном иммунитете без перекрестной реакции антител. Один пример взят из работы Магон и Агнон в отношении перекрестной реакции ГЧЗТ и перекрестной стимуляции между нативным лизоцимом яичного белка и нативным бычьим α -лактальбумином в опытах с использованием включения тимидина. Эти два белка совершенно не вступают в перекрестную реакцию на уровне антител. Аналогичные результаты были получены в нашей работе, недавно проведенной по перекрестной реакции ГЧЗТ между коллагеном и синтетическим полимером, сходным с коллагеном.

Grimet. Я также хотел бы упомянуть один опыт, но в этом опыте эффект был прямо противоположным тому, о котором говорит Sela, т. е. на уровне Т-клеток не было перекрестной реактивности при значительной перекрестной реактивности на уровне антител. Если ввести мыши Н-2^b водный раствор (Т, Г)-А--Л, то наблюдается первичный ответ только IgM и уровень IgM остается стабильным в течение минимум месяца. Если через 7 дней после первичного стимула производится вторичная антигенная стимуляция, то у мыши наблюдается классический вторичный ответ с образованием высоких титров антител IgG. Если вместо первичного антигена будет использован (Н, Г)-А--Л, то образуются первичные антитела IgM^b [т. е. перекрестно реагирующие с (Т, Г)-А--Л в высокой степени], которые сохраняются независимо от последующего введения (Н, Г)-А--Л, и антитела IgG не появляются.

Если в качестве первого антигена ввести (Т, Г)-А--Л и в качестве второго антигена (Н, Г)-А--Л, то вторичного ответа вообще нет. Таким образом, перекрестной стимуляции не происходит (как установил ранее McDevitt, пользуясь антигеном в адьюванте). Если, с другой стороны, (Н, Г)-А--Л вводится за день до первичной провокации (Т, Г)-А--Л, а затем через 7 дней снова вводится (Т, Г)-А--Л, то первичные антитела IgM к (Т, Г)-А--Л появляются как в норме, но вторичного ответа (т. е. антител IgG) нет. Таким образом, предварительная обработка (Н, Г)-А--Л эффективно блокирует переключение от IgM к IgG. Мы считаем, что это наблюдение означает, что (Н, Г)-А--Л действует как гаптен, лишенный носителя, способный взаимодействовать с рецепторами Т-клеток для перекрестно-реагирующего гаптена (Т, Г)-А--Л и индуцировать В-клетки к выполнению своих функций. Затем (Т, Г)-А--Л стимулирует как рецепторы В-клеток, так и рецепторы Т-клеток. Переключение от IgM к IgG может быть предупреждено асинхронной стимуляцией Т-клеток и В-клеток или тем, что (Н, Г)-А--Л парализует Т-клетки. Я склоняюсь к первому объяснению, но пока еще нет данных, которые позволили бы избрать один из этих механизмов.

Sela. Хочу напомнить Grimet, что (Н, Г) и (Т, Г) имеют разную специфичность но они имеют общую группу носителя (полиаланин), т. е. ту часть молекулы, которая может быть важна для возникновения толерантности и ГЧЗТ.

Председатель Rajewsky. Можно ли предположить, что две линии клеток имеют два разных вида специфичности?

Венасеггаф. При всем уважении к нашему председателю, я считаю, что, задав свой вопрос, он открыл ящик Пандоры. Все имеющиеся данные о

сравнительной специфичности клеточных иммунных реакций и гуморальных антител в основном косвенные и приняты только в рабочем порядке, хотя, я признаю это, довольно существенны.

1. Многие исследователи наблюдали более широкую перекрестную реактивность при клеточных иммунных реакциях, чем для антител, специфических к тому же антигену. Много лет назад вместе с Gell мы сделали такое наблюдение по перекрестной реактивности между БСА и ЧСА и денатурированными БСА и ЧСА.

2. С другой стороны, есть много достоверных наблюдений, особенно в опытах с системами гаптен—белок, говорящих о том, что специфичность реакций ГЧЗТ и их аналогов *in vitro* значительно более узка, чем специфичность антител, выработанных против того же антигена.

3. Кроме того, существует еще одно важное различие, наблюдаемое при использовании ДНФ-альбумина морских свинок у морских свинок. ВОК против ДНФ могут быть легко подавлены относительно низкими концентрациями ДНФ-лизина, тогда как концентрации этого лиганда, даже близкие к токсическим, очень мало подавляют повышенный синтез ДНК *in vitro*, стимулируемый иммунизирующим ДНФ—МСА, в сенсibilизированных клетках лимфатических узлов морских свинок.

Все эти различия точно доказаны, и они свидетельствуют о различии специфичности обеих форм реактивности, однако трудно сказать что они означают на уровне отдельных клеточных рецепторов. Таким образом, я полагаю, что эти различия в конечном счете удастся объяснить, только когда будет выделен рецептор Т-клеток.

Председатель Rajewsky. Благодарю Вепасеггаф, так как он сделал именно те замечания, которые, как я надеялся, будут итогом этой дискуссии, а именно, что исследование специфичности дает возможность обнаружить крайнюю гетерогенность рецепторов Т-клеток, но пока эти исследования не дали сведений, которые ясно доказывали бы, что два вида клеток имеют разный диапазон специфичности рецепторов.

Вепасеггаф. Можно без риска сделать еще одно обобщение, а именно, что некоторые типы молекулы не стимулируют тимоцитов. Это так называемые тимуснезависимые антигены, как, например, большинство сложных полисахаридов.

Raff. Мне кажется, что Вепасеггаф попал в западню, против которой он только что предостерегал. Когда он говорит нам, что существуют антигены, которые не распознаются Т-клетками, что он имеет в виду? Он хочет сказать, что есть антигены, которые, видимо, не вызывают ответа Т-клеток, но это еще не значит, что у Т-клеток нет рецепторов для этих антигенов. Например, В-клетки, по-видимому, имеют столько же рецепторов для конканавалина А, как и Т-клетки, но отвечают только Т-клетки. Это значит, что мы ничего не можем сказать о количестве, специфичности или аффинитете рецепторов на основании простого измерения ответа!

Председатель Rajewsky. Продолжим этот спор. Необходимо учитывать, что в популяциях Т- и В-клеток действуют регуляторные механизмы, которые могут дифференциально влиять на кажущуюся специфичность распознавания. Например, мы, как и Mitchison, установили, что толерантность низкой зоны к сывороточному альбумину касается исключительно Т-клеток. Этот механизм вызывает эффективную утрату некоторых специфичностей среды Т-клеток.

Таким образом, различие между специфичностью рецепторов выявляется между двумя видами клеток, хотя возможно, что физическая природа рецепторных молекул тождественна.

Benacerraf. Отвечая Rajewsky, я сказал бы, что надо различать случаи, когда различия по специфичности измеряются и выявляются и когда не выявляется ничего. Когда мы хотим измерить что-то более специфическое, чем нечто другое, надо сопоставить две реакции либо при разных концентрациях, либо в разных условиях. Именно это я имел в виду раньше. Когда мы хотим сопоставить специфичность реакции ПЧЗТ со специфичностью антител, приходится делать рабочие сопоставления на основе существования этих феноменов.

Я просто хочу сказать, что сопоставления иногда могут быть обманчивы, так как мы не знаем уровня чувствительности самих феноменов. Однако это не меняет того факта, что некоторые молекулы не вызывают реакций клеток тимусного происхождения. Пока мы не знаем, чем это объясняется, тем, что они не связываются, или другими причинами, однако ясно, что некоторые молекулы не вызывают функции клеточного иммунитета. Многие из этих молекул отнесены к так называемым тимуснезависимым антигенам.

Uhr. Проблему специфичности нельзя отделить от проблем аффинитета. Связывание бивалентных антител с поливалентным лигандом весьма отличается от их связывания с клеткой, которая может иметь тысячу единиц распознавания. Известно ли Wagner, исследовал ли Ada способность двух флагеллинов, вступающих в перекрестную реакцию на уровне ГЧЗТ, но не на уровне сывороточных антител, перекрестно реагировать в смысле связывания с В-лимфоцитами? Так можно подойти к вопросу о том, имеют ли Т- и В-клетки разные специфичности.

Wagner. Насколько мне известно, существуют данные, полученные при тестах связывания антигена с этими же флагеллинами, вступающими в перекрестную реакцию с человеческими клетками. Эти данные показывают, что при использовании двух флагеллинов вместе эффект суммируется. Очевидно, они связываются с разными В-клетками.

Cohn. Benacerraf сказал, что существуют антигены, которые не могут распознаваться тимоцитами, а именно Т-независимые антигены. Как же он объясняет тот факт, что в опытах с Т-независимыми антигенами все же достигается индукция толерантности? Считает ли Benacerraf, что животному может быть придана толерантность к липополисахаридам, к поливинилпирролидону, к пневмококковым полисахаридам и т. п.?

Benacerraf. Cohn — великий логик, и я им восхищаюсь, но я хотел бы отметить, что для того, чтобы придать клетке толерантность к антигену и проверить степень толерантности, надо определить состояние толерантности этой клетки. Если клетка не способна к ответу в нативном состоянии и если на клетку никак не может воздействовать данный антиген, как же можно утверждать, что клетке придана толерантность? Cohn может предположить, что клетка была толерантна, прежде чем антиген с ней встретился, но здесь опять-таки дело в точке зрения, а не в экспериментальных данных.

Sela. Я хотел бы выступить здесь по вопросу о тимус-независимых антигенах и их природе. Полагаю, что этот вопрос не будет чужеродным на нашей сессии. Если существуют тимуснезависимые антигены, имеются ли генетические различия по иммунному ответу у разных линий животных, и если генетические различия существуют, то возможно ли, что имеется также сцепление с H-2 или нет? Я не знаю ответа на последний из этих вопросов, но хочу упомянуть, что в последнее время принято считать по крайней мере для ряда иммуногенов, упомянутых Cohn (поливинилпирролидона, липополисахарида, *E. coli*, пневмококкового полисахарида и полимеризован-

ного флагеллина), что общим для них является их состав из повторяющихся антигенных детерминант. Здесь мы расходимся, так как большинство антигенов, о которых мы говорили в течение предшествующих трех сессий, являются синтетическими полимерами, которые имеют повторяющиеся антигенные детерминанты, тем не менее они зависят от тимуса. По-видимому, все тимуснезависимые антигены имеют еще одно общее свойство, а именно: они не подвергаются разрушению вообще или вступают в метаболизм в организме с большим трудом.

С помощью синтеза мы смогли создать ряд полимеров, очень сходных по размеру молекул, форме, молекулярной массе, составу аминокислот и, вероятно, их последовательности, но различающихся по оптической конфигурации, т. е. они имеют на всем протяжении L-аминокислоты или D-аминокислоты или L-аминокислоты внутри и D-аминокислоты снаружи или наоборот, и мы проверили все эти антигены на их зависимость от тимуса.

Мы сравнивали иммунный ответ мышей DBA/1 и SJL на четыре варианта одного и того же многоцепочечного (тирозил, глутамил)-поли-лизина, которые различаются только по оптической конфигурации аминокислот. Если полимер состоит только из L-аминокислот, он хорошо индуцирует образование антител у мышей SJL и слабо — у мышей DBA/1, тогда как остальные три полимера хорошо продуцируют антитела у обеих линий. По-видимому, в этом случае генетическое различие нивелируется изменением оптической конфигурации аминокислот в иммуногене.

ТАБЛИЦА 93

Клеточная кооперация как функция оптической конфигурации аминокислот, составляющих иммуноген, множественный кополимер (Тир, Глю)-полиПро-полиЛиз^а

Иммуноген	10 ⁸ тимоцитов	2 × 10 ⁷ клеток костного мозга	10 ⁸ тимоцитов и 2 × 10 ⁷ клеток костного мозга
L (Тир, Глю)-LПро-LЛиз	0	8	100
L (Тир, Глю)-DПро-DЛиз	НД ^б	73	56
D (Тир, Глю)-LПро-LЛиз	0	70	64
D (Тир, Глю)-DПро-DЛиз	0	63	59

^а Процент сингенных облученных SJL/J мышей, продуцирующих антитела (пассивная геммагглютинация) после переноса клеток.

^б Нет данных.

Из табл. 93 мы видим, что из 4 исследованных полимеров только полимер, состоящий полностью из L-аминокислот, зависит от тимуса и реактивность к нему нельзя перенести только костным мозгом, тогда как полимеры, состоящие только из D-аминокислот, а также полимер, состоящий внутри из L-аминокислот, а снаружи из D-аминокислот, не зависят от тимуса. Мы знаем, что существуют убедительные химические причины, почему эти последние полимеры не метаболизируются. Не существуют эндопептидазы, способной расщепить связь между двумя L-пролиновыми группами, поэтому длинная цепь поли-L-пролина, замкнутая пептидом из D-аминокислот и ε-аминогруппой лизина на полилизиновом остове, не метаболизируется. В табл. 94 показано, что эти же данные относятся и к тимэктомизированным животным.

ТАБЛИЦА 94

Взаимодействие клеток в иммунном ответе к D(Тир, Глю)-DПро--DЛиз у тимэктомированных мышей SJL

Введенные тимоциты	Введенные клетки костного мозга	Часть положительных сывороток	Процент положительных сывороток ^a
1×10^8	0	0/8	0
0	2×10^7	7/11	63
1×10^8	2×10^7	8/11	73

^a О наличии ответов, «происходящих» от донора, свидетельствуют положительные реакции в разведениях, больше чем 1:4 с сыворотками реципиентов.

ТАБЛИЦА 95

Иммунный ответ мышей DBA/1 и SJL к множественному кополимеру L (Фен, Глю)-полиD Про--поли-D-Лиз, изученный с помощью пассивной гемагглютинации

Линия мышей	Сывороточные титры, установленные с:		
	L (Фен, Глю)-DПро--DЛиз	L (Фен, Глю)--LПро--LЛиз	D (Фен, Глю--DПро--DЛиз
DBA/1	1:1024	1:512	1:256
SJL	1:128	1:8	1:128

Как видно из табл. 95, у мышей линии DBA/1 полимер, состоящий внутри из поли-D-пролина, а снаружи из полимера L-фенилаланина и L-глутаминовой кислоты, иммуногенен и оба этих участка вызывают сильный ответ.

Таким образом, мы могли проверить зависимость или независимость от тимуса не на уровне макромолекулы антигена, а на уровне отдельных детерминант. Табл. 96 ясно показывает, что образование антител к мета-

ТАБЛИЦА 96

Клеточная кооперация как функция оптической конфигурации антигенных детерминант в иммуногене, множественном кополимере (LФен, LГлю)-поли-D-Про--поли-DЛиз^a

Использованный антиген	10^8 тимоцитов	2×10^7 клеток костного мозга	10^8 тимоцитов и 2×10^8 клеток костного мозга
L(Фен, Глю)-DL Ала--LЛиз для специфичности (Фен, Глю)	20	20	82
D(Тир, Глю)-DПро--Лиз для специфичности Про--Лиз	10	60	67

^a Процент сингенных облученных мышей DBA/1, продуцирующих антитела (пассивная гемагглютинация), после переноса клеток.

болизируемой части, к пептиду L-фенилаланина и L-глутаминовой кислоты зависит от тимуса и для того, чтобы получить сильный гуморальный ответ, надо перенести не только костный мозг, но и тимоциты, тогда как образование антител к неметаболизируемому поли-D-пролину не зависит от тимуса. Остается вопрос — связаны ли реакции на такие тимуснезависимые антигены с генетическими различиями между линиями животных. Если будет получен положительный ответ, то будет интересно установить, с какими генами сцеплены эти ответы.

Levine. Мы получили некоторые данные, по-видимому, имеющие отношение к характеру рецептора Т-клеток. В основном я попытался выявить характер рецептора Т-клеток, изменяя поли-лизинный носитель. Я синтезировал полимеры лизина, аргинина, гомаргинина и орнитина и приготовил свободно-сопряженные конъюгаты с ДНФ. Я исходил из следующих допущений: во-первых, что один и тот же ген ПЛЛ контролирует распознавание 4 носителей. По-видимому, это подтвердилось. Как в аутбредных, так и в инбредных линиях морских свинок одни и те же животные отвечают на все 4 конъюгата. Другое допущение состоит в том, что распознавание носителя лимитирует скорость способности этих веществ вызывать сенсibilизацию. Третье замечание — если эти животные сенсibilизированы, они распознают иммуноген лучше, чем остальные три конъюгата. Таким образом, хотя поли-гомаргинин является относительно слабым сенсibilизатором, когда морские свинки уже сенсibilизированы, они распознают поли-гомаргинин лучше, чем поли-лизин. Следовательно, иммунологическое распознавание действует для всех четырех конъюгатов и не существует четкого ряда в смысле иммунологической специфичности классического типа. Однако в смысле индукции чувствительности обнаружен четкий ряд по индукции как сывороточных антител, так и ПЧЗТ.

Этот порядок был следующим: лизин, затем аргинин, затем гомаргинин и, наконец, орнитин.

Установив эту систему, я хочу задать вопрос: может ли этот порядок рядов отражать характер гипотетического рецептора Т-клеток? Этот порядок рядов напоминает специфичность некоторых протеаз, специфичных к основным аминокислотам. Мы установили, что трипсин имеет несколько иную специфичность, т. е. вначале аргинин, затем лизин, затем гомаргинин и, наконец, орнитин. Однако некоторые протеазы, например, участвующие в метаморфозе морского ежа (в опытах Tgoll), дают тот же порядок рядов со специфичностью, установленной для гена ПЛЛ. Таким образом, я хочу подчеркнуть, что гипотетический рецептор Т-клеток может быть подобен ферменту, а не иммуноглобулину, распознающему эти основные носители полиаминокислот со специфичностью, которая напоминает специфичность связывания протеазы с субстратом.

Возможно, что эта специфичность отличается от классической иммунологической специфичности, наблюдаемой в ответе на иммунизацию этими антигенами.

Председатель Rajewsky. В заключение четвертой сессии я хотел бы вкратце подытожить свои впечатления о том, что в сущности вытекает из нашей живой дискуссии. Безусловно, имеются споры по распознаванию Т-клетками. Некоторые участники настаивают на том мнении, что рецепторы Т-клеток не являются иммуноглобулином. В основном они исходят из того, что гены Ig не сцеплены с какими-либо известными иммуноглобулиновыми генами и что ряд исследователей не смогли прямо или косвенно обнаружить иммуноглобулин на поверхности Т-клеток. Последнее обстоятельство, хотя на нем настаивали двое выступавших, на мой взгляд, на данном

этапе не может считаться вполне убедительным отчасти из-за противоположных данных, полученных в других лабораториях. Другие исследователи, к которым отношусь и я, все же считают возможным, что Т-клетки, как и В-клетки, несут иммуноглобулиновые рецепторы. Указания на наличие иммуноглобулиновых рецепторов существуют, в частности, для хелперных Т-клеток. При обсуждении специфичности распознавания Т- и В-клеток выявилась крайняя разнородность как Т-клеточных, так и В-клеточных рецепторов. На основании исследования специфичности распознавания нет причин предполагать различную природу рецепторов Т- и В-клеток.

Здесь было высказано предположение, безусловно заслуживающее внимания, что Т-клетки несут две разные системы распознавания. Одна ответственна главным образом за распознавание клеток клеткой, а другая напоминает систему В-клеток. Как и в большинстве оживленных дискуссий, здесь мы поставили, несомненно, больше вопросов, чем удалось решить.

МОДЕЛИ НА ЖИВОТНЫХ ПОЛИГЕННОГО КОНТРОЛЯ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ

Полигенный контроль вирусного лейкемогенеза у мышей. «Естественная история» вирусов мышинного лейкоза. Сцепленная с Н-2 восприимчивость к заражению лимфоцитарным хориоменингитом (ЛХ). Повреждения, опосредованные иммунными комплексами, при хронической ЛХ-инфекции. Влияние вирусной инфекции на аутоиммунитет у мышей NZB. Полигенный контроль образования аутоантител. Генетический контроль иммунного ответа на аутоантигены. Различия в устойчивости к инфекциям у линий мышей с сильной и слабой способностью к образованию антител и отторжению опухолей. Сцепленный с Н-2 контроль отторжения пересаженного костного мозга у облученных мышей.

Председатель Allison. Я хотел бы вкратце очертить область, которую мы охватили сегодня. Это может быть полезно для того, чтобы правильно ориентировать дискуссию на этой сессии. Прежде всего мы должны различать эффекты одного гена и полигенные эффекты, как показано на рис. 71, и затем попытаться установить область их действия. Мы знаем, что некоторые эффекты проявляются во всех клетках организма, например, способность поддерживать размножение некоторых вирусов. На этом уровне действуют некоторые интересные эффекты одного гена. Есть также ряд эффектов, проявляющихся на уровне макрофагов. Макрофаги несомненно играют важную роль как барьер против распространения инфекции. Известно, что многие вирусы при введении их в легкие, кожу или в другие органы быстро поглощаются макрофагами. Если они могут размножаться в макрофагах, то, следовательно, существует возможность распространения их на остальные участки тела, а следовательно, диссеминированной инфекции, если же они не могут размножаться в макрофагах, то инфекция локализуется в них.

Некоторые генетические различия подверженности мышей заболеваниям, основанные на одиночных генах, проявляются в способности вируса к размножению в макрофагах. Кроме того, существует эффект, проявляющийся в лейкоцитах; от обсуждения этого эффекта нам придется отказаться. В качестве примера можно назвать наследственные дефекты у норок, создающие предрасположенность к алеутской болезни, и хроническую гранулематозную болезнь у человека. На этой конференции нас особенно интересуют генетические факторы, проявляющиеся в иммунокомпетентных клетках, а именно способность иммунокомпетентных клеток реагировать против инфекций и предупреждать их распространение или предупреждать опухолевый рост. Относительная роль Т- и В-лимфоцитов различна в разных условиях, и мы должны обратить на этот вопрос то внимание, которое он заслуживает.

Остановимся вначале на различиях между эффектами одного гена и множественных генов. В популяции наблюдается различное распределение резистентности. Резистентность может проявляться по-разному, например

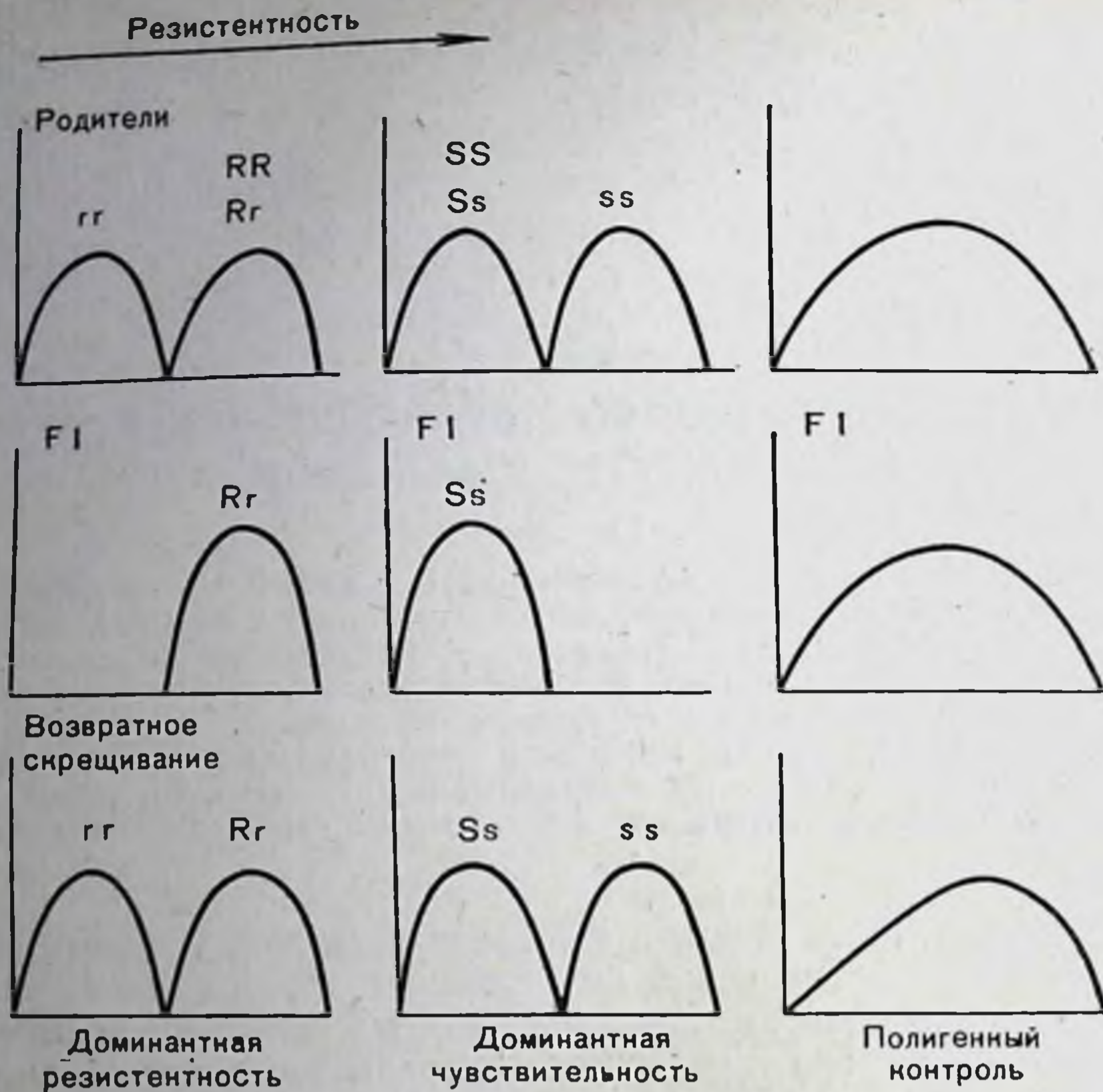


Рис. 71. На диаграмме представлено распределение чувствительности и невосприимчивости в популяции, когда отдельные гены распределяются и когда имеется полигенный эффект. Ожидаемые модели наследования невосприимчивости против инфекции основываются на трех гипотезах. А (слева) — одна пара аллелей, детерминирующих доминантную невосприимчивость, производит основной эффект. Б (в середине) — одна пара аллелей, детерминирующих доминантную чувствительность, производит основной эффект. В — множество генов обуславливает чувствительность. Верхние кривые показывают поколения родителей, резистентность которых указана на абсциссе в произвольных единицах (например, пропорция животных, выживающих при заражении определенной дозой вируса, или доза вируса, требующаяся для развития определенного ответа). Средние кривые показывают потомство в результате скрещивания высокочувствительных и высокоустойчивых животных. Нижние кривые показывают потомство возвратного скрещивания с соответствующим типом родителей.

по количеству микроорганизмов, необходимых, чтобы убить животное или вызвать клинически выраженную болезнь или образование опухоли. В отношении одиночных основных генов мы обычно находим прерывистое распределение, либо бимодальное, либо тримодальное в зависимости от того, подобны ли гетерозиготы той или другой популяции гомозигот или же отличаются от нее. В первом случае может доминировать либо резистентность, либо подверженность болезни. При возвратном скрещивании основные гены расщепляются и опять-таки дают бимодальное распределение. Напротив, при полигенном наследовании мы имеем кривую нормального распределения в поколениях родителей и гибридов F_1 .

Если начать селекцию на том или другом «конце» кривой, мы либо повышаем резистентность, либо повышаем предрасположенность совершенно таким же образом, как мы селектируем число щетинок у дрозофиллы, или, как рассказал нам Biozzi, способность мышей вырабатывать антитела

в больших или очень низких количествах. Такая селекция уже производилась, например, в отношении резистентности против инфекции, вызываемой сальмонеллами в работе Gowen, ставшей уже классической, который селекционировал и разводил линии мышей по этому признаку.

Bang, Kargowski описали генетические факторы, влияющие на способность мышинных макрофагов поддерживать репликацию вирусов. Вирус мышинного гепатита соответствующего штамма убивает чувствительных к нему взрослых мышей Princeton, но не мышей резистентной линии СЗН. Перитонеальные макрофаги мышей Princeton могут поддерживать размножение вируса, а макрофаги резистентных мышей не поддерживают размножения. Когда мы проследим за генами резистентности в поколении F₂ и последующих поколениях, мы увидим, что уязвимость животных параллельна способности макрофагов поддерживать репликацию вируса. То же наблюдается в отношении вирусов группы В, переносимых членистоногими, т. е. вируса желтой лихорадки и вируса лихорадки Западного Нила.

Перейдем к генам, проявляющимся на уровне иммунокомпетентных клеток. Известно, что вирус полиомы ведет к образованию опухолей при перевивке новорожденным мышам чувствительных линий, тогда как другие инбредные линии резистентны. Одной из резистентных линий являются мыши С57. В обычных условиях, если ввести вирус новорожденным животным, образуется очень малое количество опухолей, тогда как тимэктомированные животные, или животные, обработанные антилимфоцитарной сывороткой, становятся весьма уязвимыми. Кроме того, уничтожается нормальный возрастной барьер для индукции опухоли. Как видно из табл. 97, вирусы, вве-

ТАБЛИЦА 97

Возникновение опухолей при инокуляции вируса полиомы взрослым нормальным и тимэктомированным мышам СВА

Предварительная обработка	Восстановление к 7 нед	Число животных	Опухоли, %
Нормальный кроличий глобулин	Нет	24	0
Тимэктомия + АЛГ	»	14	100
То же	Нормальные лимфоидные клетки	10	90
» »	Сенсибилизированные лимфоидные клетки	11	0
» »	Сенсибилизированные лимфоидные клетки	10	0
» »	Сенсибилизированные лимфоидные клетки, обработанные антисывороткой и комплементом	6	83

денные взрослым мышам СВА, не вызывают опухолевого роста, тогда как животные с подавленным иммунитетом, даже если они получают вирус во взрослом возрасте, всегда заболевают опухолями. Рост опухолей не предупреждается введением антител после вируса, но предупреждается переносом сингенных сенсибилизированных лимфоидных клеток. Таким образом, мы имеем пример эффекта Т-клеток, чрезвычайно важного для определения наследственной резистентности некоторых линий мышей к онкогенному вирусу.

Можно проанализировать относительное значение гуморального и клеточного иммунитета, сравнивая чувствительность взрослых животных к вирусной инфекции, если воспользоваться иммунодепрессантами (например,

удобно применить циклофосфамид), а затем селективно восстанавливать иммунологическую функцию. Zisman и я работали на взрослых мышах линии СВА с вирусом Коксаки В-3. Из табл. 98 видно, что нормальные не-

ТАБЛИЦА 98

Смертность взрослых мышей СВА после введения вируса Коксаки В-3, усиливающаяся после циклофосфамида и защиты пассивно примененными антителами

Обработка	Число мышей	Смертность, %
Необработанные контроли	16	0
Циклофосфамид (72 ч после вируса)	16	100
Циклофосфамид + антитела (4-й и 15-й дни после вируса)	14	0

обработанные контрольные взрослые животные совершенно резистентны, но после одной дозы циклофосфамида все они погибают. Это можно предупредить введением антител. Таким образом, создается впечатление, что в этих условиях самих антител достаточно, чтобы сдержать инфекцию.

Однако при некоторых вирусных инфекциях, как указано в табл. 99, положение обстоит иначе и можно доказать решающую роль клеточного иммунитета. Среди неонкогенных вирусов классическим примером является вирус герпеса. Такие вмешательства, как тимэктомия или введение АЛС, резко повышают смертность от инфекции этого рода, а также при заражении вирусами оспы. Антитела, введенные после того, как инфекция уже укоренилась, не дают защиты.

ТАБЛИЦА 99

Эффект подавления клеточного иммунитета на исход вирусной инфекции у мышей

Вирус	Возраст, недели	Количество мышей	Обработка	Смертность, %
Герпеса	4	25	НКС	0
		14	Тимэктомия	71
		13	АЛС	100
Желтой лихорадки	4	58	Без	16,4
		24	АЛС	16,6
Коксаки В-3	6	25	Без	0
		22	Тимэктомия	0
Эктромелии (Blender)	Молодые	26	НКС	20
	Взрослые	26	АЛС	100

Вероятно, то же происходит и у человека. В табл. 100 перечислены вирусные инфекции, усиливающиеся при иммунных дефектах. Теперь мы знаем, что больные с неосложненной агаммаглобулинемией необыкновенно подвержены паралитическому полиомиелиту, но не подвержены заражению большинством других вирусов. Дефекты клеточного иммунитета, как врожденные, так и приобретенные, весьма повышают подверженность к инфек-

циям, вызываемым вирусами оспы, герпеса и кори. Возможны и другие случаи, когда при персистенции вирусных инфекций, вероятно, обусловленной неадекватными иммунными ответами хозяина, важно расщепление отдельных генов у человека.

ТАБЛИЦА 100

«Потенцирование» вирусных инфекций при различных типах дефектов иммунного ответа

Дефект	Вирусная инфекция	Авторы
Гипогаммаглобулинемия без повреждения клеточного иммунитета Дефицит клеточного иммунитета (\pm нормальные иммуноглобулины)	Паралитический полиомиелит	Schur, Borel, Gelfand, Heper, Rosen (1970)
	Коровья оспа	Fulginiti e. a. (1968), O'Connell, Karson, Barron (1964)
	Герпес	Cooper e. a. (1968), Kretschmer, August, Rosen, Janeway (1969)
	Ветряная оспа	Hayes, Beam, Valentine (1965), Lux e. a. (1970)
	Цитомегаловирус	Miller and Schieken (1967) Haworth e. a. (1967), Cooper e. a. (1968)
	Корь	Nahmias, Griffith, Salsbery, Yoshida (1967), Cooper e. a. (1968)

Для справки: Allison A. C. Immunity against viruses. — In.: The scientific basis of medicine annual reviews, London; Athlone Press, 1972, p. 49—73.

На основании работы Blumberg и его коллег можно предполагать, что у лиц, гомозитных по гену чувствительности в популяции Юго-Восточной Азии, наблюдается персистирование австралийского антигена. Serpellini получил аналогичные данные, изучая популяции Сардинии. Полагаю, что он расскажет нам об этих данных на шестой сессии. Таким образом, мне кажется, я пояснил, то, что я хотел сказать, а именно, что у нас достаточно много примеров для иллюстрации каждой из упомянутых мной ситуаций. Теперь Lilly подробнее расскажет нам об одной особенно хорошо изученной ситуации, о генетике чувствительности мышей к лейкемогенным вирусам.

Lilly. Литературные данные, собранные в нескольких направлениях, доказывают, что чувствительность к лейкозу у человека в значительной мере контролируется генетическими факторами. Однако столь же ясно, что лейкоз — это болезнь не одного гена, контролируемая рядом генов. Еще на заре генетики, в частности в периоде с 1910 г. и до 20-х годов, изучались полигенные признаки, отчасти в центре этих исследований находились работы East и соавт. В результате этих исследований, проведенных в то время и продолженных более глубоко в дальнейшем, были установлены многочисленные способы выразить в математических понятиях признаки, которые контролируются множественными генами, и влияние их внутри популяции. Это тема количественной генетики. Трудность заключается в том, что, пытаясь установить основные механизмы полигенного контроля, мы можем только вслепую протягивать руку в черный ящик и поодиночке вынимать оттуда гены, идентифицировать их, составлять их карту и изучать их особые механизмы действия.

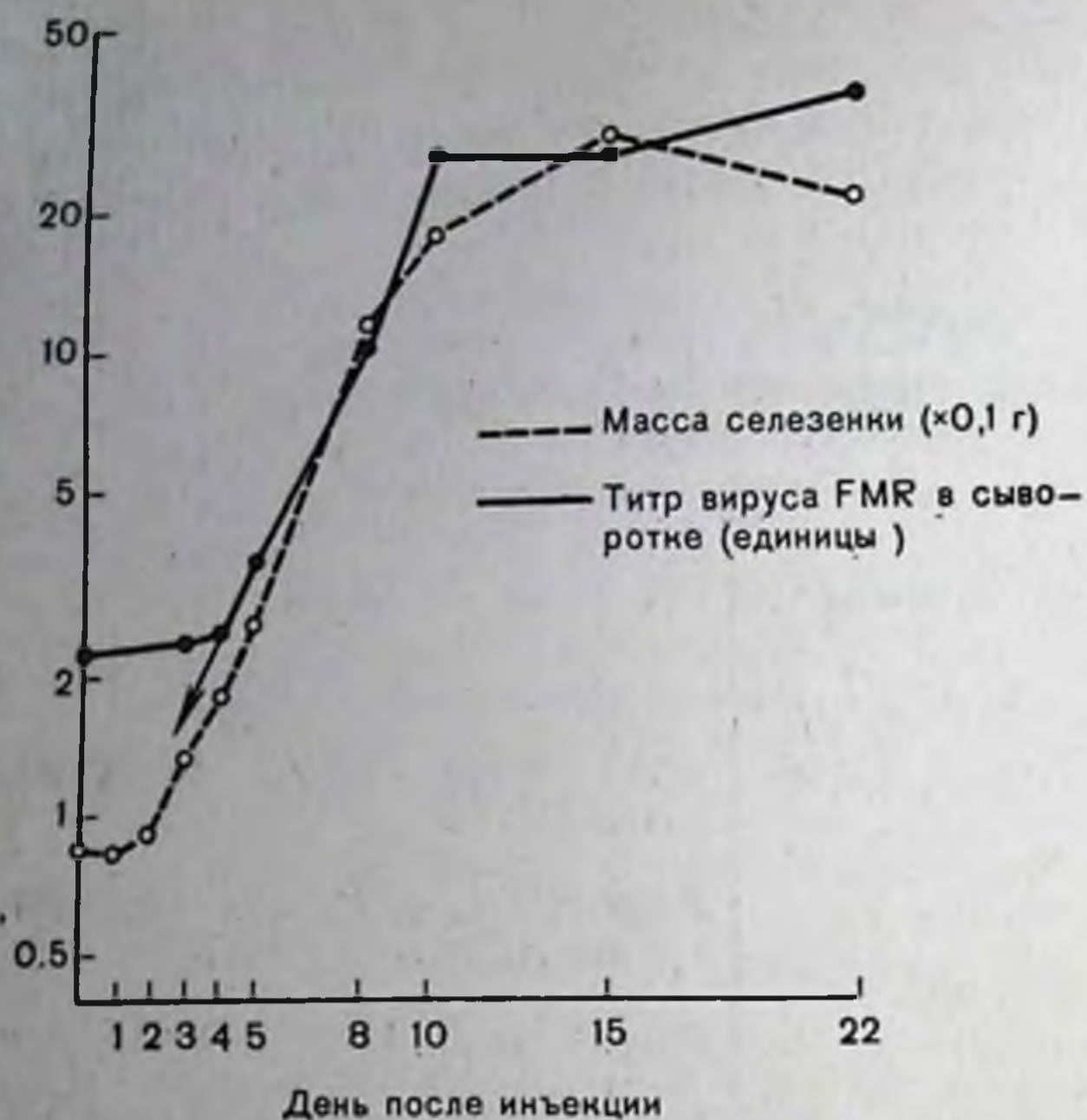


Рис. 72. Логарифмическое увеличение массы селезенки и титра вируса FMR в течение болезни, вызванной вирусом Friend.

генетический контроль. В табл. 10 перечислены 4 категории генов, о которых я буду говорить. Следует запомнить, что все категории, видимо, влияют на развитие болезни посредством совершенно различных механизмов. Первый уровень сложности — это уровень генетического контроля, оказываемого геномом хозяина на патологический процесс. Второй уровень сложности — это сложный характер самой болезни. Болезнь, вызываемую вирусом Фрейнда у высокопредрасположенного хозяина, обычно называют эритролейкозом. Это значит, что клетка-мишень для вирусной инфекции и последующего размножения вируса — это клетка, образующаяся на относительно ранней стадии развития эритроидного ростка. Указанное обстоятельство отличает болезнь, вызываемую вирусом Фрейнда, от болезней, вызываемых большинством вирусов мышинных лейкозов, которые обычно индуцируют лимфоидные новообразования.

На рис. 72 показан основной симптом болезни, вызываемой вирусом Фрейнда, т. е. быстрая, почти взрывная, пролиферация клеток селезенки. Очень скоро после инокуляции большой дозы вируса чувствительному хозяину начинается увеличение селезенки, она продолжает увеличиваться с логарифмической скоростью в течение примерно 7—8 дней со временем удвоения около 1,6 дня. Эта генетика станет еще более внушительной, если я скажу вам, что, согласно моим расчетам, если бы такие темпы роста продолжались еще 5 дней, то вся мышшь превратилась бы в селезенку. К счастью, для мышши, этого не происходит. Скорость роста стабилизируется, селезенка прекращает увеличиваться. Большинство животных пока не погибает. Пролиферация клеток селезенки прекращается примерно в конце 2-й недели, а смерть обычно наступает через 4 нед.

Это наблюдение само по себе указывает на два уровня сложности болезни. То, что я называю вирусологической фазой болезни, это тот период болез-

В качестве модели полигенных болезней я опишу здесь болезнь, вызываемую вирусом Фрейнда. Может быть, ее нельзя назвать идеальной моделью лейкозов у человека, так как спонтанный лейкоз даже у мышей вызван не экзогенно внесенным вирусом, а эндогенным вирусом. Тем не менее, как будет ясно из дальнейшего, гены, важные для генетического контроля болезни, вызываемой вирусом Фрейнда, по-видимому, действуют таким же образом и при спонтанном лейкозе у мышей.

Эту проблему можно рассмотреть на трех уровнях сложности. Мы изучаем полигенные системы, поэтому нашим первым уровнем сложности будет

ни, когда быстро растет селезенка, и иммунологической фазой болезни — когда скорость пролиферации клеток уменьшается. Болезнь сложна также потому, что специфическое свойство индуцировать эритролейкоз (т. е. способность индуцировать злокачественное перерождение эритроидного ростка) может быть ликвидировано в вирусной популяции путем повторного пассажа вируса через некоторых резистентных животных. Этот прием дает препарат вируса, вызывающий классический лимфолейкоз, но уже не вызывающий быстро развивающийся эритроидный лейкоз. Такой лимфолейкоз мышей имеет значительно более длительный латентный период и по происхождению является в основном практически моноклональным.

ТАБЛИЦА 101

Гены, контролирующие чувствительность к лейкемогенным вирусам

Гены	Эффект на:	Изученные системы
Fv-2	Вирусный компонент, комплекса вируса Фрейнда, образующий фокусы в селезенке	Вирус Фрейнда
W, Sl, f	Гемопоэтические клетки (наследственные анемии)	Вирус Фрейнда
Fv-1	Вспомогательный вирусный компонент вируса Фрейнда	Вирус Фрейнда, естественно встречающиеся лейкемогенные вирусы
Rgv-1 (H-2)	Иммунный ответ к антигенам, связанным с вирусом	Вирус Гросса, В/Т-Л вирус, вирус Фрейнда, радиационный лейкемогенный вирус, вирус опухоли молочной железы

Таким образом, мы рассмотрели сложное заболевание, индуцируемое вирусом Фрейнда. Но остается еще третий уровень сложности, а именно сложность самого вируса, показанная в табл. 101. Steeves и Axelrad открыли, что вирус Фрейнда индуцирует в селезенке чувствительных хозяев образование очагов, которые можно легко обнаружить примерно через 9 дней после внутривенного введения вируса. Этот тест широко применялся для изучения вирусологических аспектов болезни, вызываемой вирусом Фрейнда.

Согласно предположению Steeves, к которому самостоятельно пришли также Fieldsteel и соавт., вирус состоит по крайней мере из двух разных вирусных популяций, причем, для того чтобы вызвать эритроидную болезнь, необходимо одновременное заражение обеими популяциями. Однако после пассирования вируса через животных, резистентных к эритроидной болезни, выделяется вирус лимфолейкоза. Очевидно, это означает, что один из компонентов вируса Фрейнда утрачен, — тот компонент, который индуцирует образование очагов в селезенке и который получил название вируса, образующего селезеночные очаги, или СООВ. Остаточная популяция, вызывающая классический лимфолейкоз у чувствительных линий мышей, получила название вируса лимфолейкоза или ЛЛВ. Таким образом, как показано в табл. 102, комплекс вируса Фрейнда состоит из смеси СООВ и ЛЛВ. В препарате вируса Фрейнда после удаления СООВ остается ЛЛВ. В дальнейшем станет ясно, что есть веские основания полагать, что вирус ЛЛВ также сложный.

Первым геном, управляющим вирусологической фазой болезни, вызываемой вирусом Фрейнда, является локус Fv-2 (табл. 103). В локусе Fv-2 имеются два аллеля и все имбредные мыши гомозиготны по одному из них.

Существует аллель чувствительности (Fv-2^s) и аллель резистентности (Fv-2^r). Этот ген локализован на карте и он сцеплен с локусом ослабленной коричневой окраски в группе сцепления 2 у мышей. Следовательно, он не имеет

ТАБЛИЦА 102

Постулированный состав стандартных препаратов вирусов Фрейнда

ВФ = ВОСФ + ВЛЛ	
ВФ	— вирус Фрейнда
ВОСФ	— вирус, образующий очаги в селезенке (дефектный вирус, требующий одновременного заражения вспомогательным вирусом для созревания; показывает высокий уровень специфичности для эритроидных клеток)
ВЛЛ	— вирус лимфатической лейкемии (штамм вируса, который имеет вспомогательную активность для ВОСФ, индуцирует лимфатическую лейкемию у животных определенных генотипов и показывает более широкий диапазон тканевой специфичности, чем ВОСФ).

ТАБЛИЦА 103

Фенотип различных генотипов Fv-2

Генотип Fv-2	Фенотип
Fv-2 ^s /Fv-2 ^s Fv-2 ^s /Fv-2 ^r Fv-2 ^r /Fv-2 ^r	Высокая чувствительность к образованию очагов под действием ВОСФ Высокая резистентность к образованию очагов под действием ВОСФ

отношения к Н-2 в группе сцепления 9. Чувствительность в локусе Fv-2 является доминантной, т. е. между животными, гомозиготными или гетерозиготными по аллелю чувствительности, нет разницы.

Резистентность, обусловленная геном Fv-2^r, практически абсолютна, т. е. у животных, гомозиготных по резистентному аллелю, на Fv-2 совсем не образуется селезеночных очагов. По-видимому, Fv-2 влияет на компонент СООВ вируса Фрейнда и не может прямо влиять на компонент ЛЛВ.

ТАБЛИЦА 104

Тропизм вируса Фрейнда, определяемый в отношении его взаимодействия с генотипом хозяина Fv-1

Fv-1 генотип	Ген: Fv-1 Аллели: Fv-1 и Fv-1 ^B Фенотипы		
	Количество пиков кривой доза — ответ с ВФ различного тропизма		
	Н-тропный (F-S)	НВ-тропный (F-B)	В-тропный (F-T)
Fv-1 ⁿ /Fv-1 ⁿ	Один	Один	Много
Fv-1 ⁿ /Fv-1 ^b	Много	»	»
Fv-1 ^b /Fv-1 ^b	»	»	Один

Существует по крайней мере один штамм вируса Фрейнда, содержащий, видимо, мутантную форму СООВ, значительно менее чувствительную к резистентности, контролируемой аллелем Fv-2^r. Это создает еще один уровень различия среди вирусных популяций. Ясно, что свойства, определяющие СООВ, в отличие от ЛЛВ, было бы очень трудно объяснить моногенным различием между двумя вирусами. Поскольку в системе Fv-2 полностью доминирует чувствительность, есть основания полагать, что контроль этого гена начинает действовать очень рано в процессе заражения. Естественно, приходит мысль о рецепторах или о снятии покрытия с вируса или о каком-либо феномене, связанном с проникновением вируса в чувствительные клетки. Однако дело обстоит не просто, так как можно осуществить пассаж вируса Фрейнда через животных, резистентных к Fv-2, хотя у этих животных и не образуется селезеночных очагов, но требуется несколько пассажей вируса, а не один пассаж, чтобы ликвидировать компонент СООВ. Это говорит против гипотезы о рецепторах, хотя и не полностью ее исключает. В табл. 103 показано фенотипическое проявление различных генотипов Fv-2. Компонент СООВ комплекса вируса Фрейнда постепенно теряется при пассивировании через генетически резистентных хозяев. Но, как я уже говорил, ген Fv-2, по-видимому, не влияет на чувствительность к ЛЛВ.

Второй класс генов, весьма влияющих на ответ хозяина к вирусу Фрейнда, — это гены наследственных анемий. Известно, что три таких гена влияют на болезнь, вызываемую вирусом Фрейнда: W, Sl и f. Поскольку классическая болезнь вируса Фрейнда весьма специфична для эритроидной ткани, можно было бы полагать, что гены, влияющие на созревание эритроидных клеток должны влиять на патологический процесс. И, действительно, это предположение подтвердилось во всех трех исследованных ситуациях.

Попутно может быть поставлен еще один вопрос. В связи с тем фактом, что вирус Фрейнда обладает высокой тканевой специфичностью к эритроидным клеткам-предшественникам, возникает предположение: может быть, ген Fv-2, который, как известно, не сцеплен с геном, влияющим на кроветворную систему, сам по себе является геном развития такого типа, который проявляется исключительно в эритроидных клетках? Это ограниченное проявление гена Fv-2 могло бы объяснить высокую тканевую специфичность вируса Фрейнда. Однако это предположение остается чисто теоретическим и должно быть проверено в дальнейшем.

Третий ген, на котором я хотел бы остановиться, — это ген, называемый Fv-1, определяющий ответ хозяина к вспомогательному компоненту в вирусе Фрейнда (табл. 104). Вспомогательная вирусная активность является свойством ЛЛВ, а также других лейкозных вирусов. Напомним, что для того, чтобы вызвать классическую болезнь вируса Фрейнда, необходимо одновременное заражение СООВ и ЛЛВ, только СООВ не имеет инфекционных свойств ни для одной из клеток, т. е. это дефектный вирус. Он растет только при наличии одновременной инфекции, вызванной ЛЛВ, которая, видимо, допускает созревание вирусных частиц СООВ, восполняется компонентом вируса ЛЛВ или какой-то популяцией внутри ЛЛВ. Именно эта вспомогательная активность управляется геном Fv-1. Компонент ЛЛВ эта вспомогательная активность управляется геном Fv-1. Компонент ЛЛВ в этом смысле не дефектен и может расти в отсутствие СООВ. Ген Fv-1 имеет два аллеля, которые когда-то называли Fv-1^s (чувствительный) и Fv-1^r (резистентный). С тех пор оказалось, что эти названия непригодны и эти аллели теперь называют соответственно Fv-1^a и Fv-1^b. Разница между двумя аллелями касается их способности содействовать пролиферации различных типов вспомогательного вируса. Можно представить себе, что

вспомогательный компонент вируса Фрейнда принадлежит к одному из трех возможных типов, которые называются N-, B-, или NB-тропными. Тропизм вируса определяется с точки зрения его взаимодействия с генотипом хозяина (табл. 104). Животные гомозиготного генотипа Fv-1ⁿ разрешают рост N-тропных вирусов. Напротив, животные, гомозиготные по аллелю Fv-1^b, разрешают рост B-тропных вирусов, но не разрешают роста N-тропных вирусов.

Третий тип вспомогательного компонента называется NB-тропным. Это искусственно приобретенное свойство вируса после насильственного пассажа N- или B-тропного вируса через клетки хозяина Fv-1^{b/b} или Fv-1^{n/n} соответственно. Этот приобретенный NB-тропизм выражается в нечувствительности к потенциальному барьеру, представленному геном Fv-1, т. е. NB-тропные вирусы растут одинаково хорошо у хозяев с любым генотипом Fv-1.

Все исследованные имбредные линии мышей можно разделить на две категории в отношении их N- или B-свойств. N-тропные вирусы значительно лучше растут у животных и в клетках генотипа Fv-1ⁿ, чем B-тропные вирусы, тогда как у животных генотипа Fv-1^b пролиферация B-тропных вирусов весьма значительно превышает пролиферацию N-тропных вирусов.

Fv-1 не локализован на карте мышиногенома, но он расщепляется независимо от Fv-2, а также от H-2. Мы знаем также довольно большое число других участков мышиногенома, с которым этот ген не связан. Надо подчеркнуть, что в этой системе Fv-1, в отличие от системы Fv-2 у гетерозиготных мышей доминирует резистентность. Следует помнить, что чувствительность является доминантной для Fv-2, но для Fv-1 доминантной является резистентность. Кроме того, эта резистентность не такая полная, как резистентность по генам Fv-2. Резистентность в системе Fv-1 относительна. Она выражается кривой титрования у данного хозяина. При пробе на селезеночные очаги N-тропный вирус, титруемый у мышей, гомозиготных по Fv-1ⁿ, дает кривую титрования с одним пиком, тогда как тот же вирус, титруемый у животных, гетерозиготных или гомозиготных по аллелю Fv-1^b, дает кривые титрования с множественными пиками. B-тропный вирус характеризуется обратной закономерностью, т. е. он дает кривые титрования с одним пиком у мышей гомозигот и кинетику множественных попаданий у мышей гомозиготных или гетерозиготных по Fv-1ⁿ. У животных, гомозиготных по Fv-2^r, не образуется селезеночных очагов независимо от типа Fv-1. Я хочу вновь подчеркнуть, что мыши, гетерозиготные по локусу Fv-1, относительно резистентны как к N-тропным, так и к B-тропным вирусам.

Ген Fv-1 не только проявляется при пробе на селезеночные очаги, но и лежит в основе N- или B-тропизма того же вирусного продукта, который выявляется *in vitro* при тесте ХС, модифицированном тесте на бляшкообразование.

Есть много штаммов вирусов, активных при тесте ХС, но обладающих очень слабой или совсем не обладающих лейкемогенной способностью *in vivo*. Следовательно, можно полагать, что ген Fv-1 влияет на самые разнообразные опухолевые РНК-вирусы С-типа.

Феномен кинетики с множественными пиками установлен как *in vitro*, так и *in vivo* у хозяев с несоответствующим аллелем Fv-1 и из этого феномена можно сделать несколько выводов. Во-первых, сам компонент ЛЛВ может быть сложным, так как мы полагаем, что кинетика с двумя и более пиками означает требования в одновременном заражении двумя и более вирусными частицами. Нет необходимости в том, чтобы две вирусные частицы,

требуемые для инфицирования, отличались друг от друга, но поскольку возможно, что они все же должны отличаться, весьма вероятно, что ЛЛВ состоит из двух разных типов частиц, причем оба типа необходимы для инфицирования животных с несоответствующим генотипом Fv-1.

Поскольку относительная резистентность является доминантной, наличие одного несоответствующего аллеля локуса Fv-1 может превратить кривую титрования, которая иначе имела бы один пик, в кривую титрования с множественными пиками. Это означает, что продукт локуса Fv-1 сам по себе является регуляторным фактором при индукции вирусной инфекции, хотя безусловно это еще не доказано. Можно было бы рассматривать генетические доминантные феномены, в данном случае резистентность, как активные феномены.

В заключение я могу сказать, что есть довольно много указаний на то, что Fv-1 влияет не только на болезнь вируса Фрейнда, но и на чистоту спонтанного лейкоза у мышей.

Возьму еще один последний пример для подробного анализа. Остановлюсь на гене, который называется локусом Rgv-1 (резистентность к вирусу Гросса). Он расположен в комплексе H-2 мыши в группе сцепления (9) и влияет на чувствительность к лейкозным вирусам. Этот эффект гена Rgv-1 доказан для различных вирусов, не только вируса Фрейнда, но также вируса Гросса, вируса В/Т-Л, вируса лучевого лейкоза и вируса опухолей молочных желез. В литературе есть также данные, позволяющие предполагать его влияние на вирус мышинной саркомы и вирус миелогенного лейкоза Абельсона.

Можно было бы сказать, что данный аллель¹ H-2 влияет на все эти вирусы в одном и том же направлении. Аллель H-2^b контролирует относительную резистентность, а аллель H-2^k — относительную чувствительность ко всем этим вирусам. На этом основании можно предположить, хотя это еще и не доказано, что влияние Rgv-1 на различные лейкозные вирусы обусловлено одним и тем же геном, а не рядом тесно сцепленных генов.

При попытках картировать локус Rgv-1 в комплекс H-2 выяснилось, что субобласть H-2D не имеет отношения к феномену Rgv-1. При изучении распределения аллелей Ss—Slp и Tla между линиями не найдено какой-либо корреляции с влиянием Rgv-1 и можно допустить, что эти два локуса не ответственны за его активность. Поэтому приходится сделать вывод, что Rgv-1 локализуется где-то в тесной связи с субобластью H-2K или с субобластью Ig-1 в системе H-2. Пока более точных сведений дать нельзя.

Влияние Rgv-1 на лейкозный вирус является относительным, т. е. количественным; Rgv-1 влияет на кривую доза вируса — ответ. Относительно чувствительные животные благодаря своему генотипу Rgv-1 дают более низкую кривую доза—ответ, чем животные с «резистентным» типом Rgv-1.

Когда была впервые установлена локализация эффекта Rgv-1 в комплексе H-2, настоятельно напрашивалась мысль, что, поскольку антигены H-2 находятся на клеточной поверхности, механизм действия H-2, контролирующего чувствительность к вирусам, возможно, заключается в том, что антигены H-2 служат рецепторами вирусов. Теперь совершенно ясно, что, каков бы ни был механизм Rgv-1, он не действует как рецептор. Прежде всего об этом говорит тот факт, что эффект локуса Rgv-1 является относительным и количественным, а не абсолютным по принципу «все или ничего». Далее эффект гена Rgv-1 действует в относительно поздней стадии болезни. Об этом говорит тот факт, что проба на селезеночные очаги, которая ста-

¹ В современной терминологии — гаплотип. — Прим. ред.

вится в первые 9 дней после инокуляции вируса, показывает лишь очень незначительное влияние гиплотипа H-2 животного. Животные, различающиеся только по Rgv-1¹, являются относительно чувствительными и относительно резистентными и при пробе на селезеночные очаги разница между ними по чувствительности к вирусам только двукратная. Однако, если обратиться к более поздним стадиям болезни, то можно обнаружить значительно большую разницу между теми же линиями мышей по ответу на вирус порядка 10—20 раз.

Идентичен ли Rgv-1 с Ig-1 или какой-то его частью? Возможно, это так. Если обратиться к образованию антител против FMR (общий антиген Фрейнда, Мелони и Раушера) у животных двух линий, то мы увидим, что животные, чувствительные к вирусу по своему типу Rgv-1, вырабатывают несколько меньше антител, чем резистентные животные. Опять-таки разница здесь невелика, примерно двукратная, т. е. не такая уже большая. В пользу Ig-1 говорит также тот факт, что в соответствующих системах у животных, гетерозиготных по резистентным и чувствительным аллелям Rgv-1, наблюдается промежуточный фенотип по сравнению с животными, гомозиготными по двум аллелям.

Наконец, я хотел бы остановиться на одном наблюдении, которое, быть может, не подтверждает мысли, что Ig-1 и Rgv-1 могут быть тождественны. Я упоминал антиген FMR, специфический опухолевый трансплантационный антиген, индуцируемый на поверхности клеток, зараженных вирусом Фрейнда. Хотелось бы теперь остановиться на появлении этого антигена у двух линий мышей: BALB/c, имеющей аллель H-2^d, и конгенной линии, выведенной нами, BALB/c-H-2^b. Мы называем эту линию BALB.B.

После инокуляции большой дозы вируса у животных этих двух конгенных линий антиген FMR на селезеночных клетках, начиная от нулевого уровня проявления, появляется примерно в одинаковые сроки у обеих линий животных и, примерно, на 10-й день достигает максимального уровня проявления у обеих линий. В течение первых 2 нед болезни, по-видимому, нет значительной разницы по образованию антигена FMR в селезеночных клетках этих двух линий мышей. Однако, если продолжать наблюдать за уровнем проявления антигена, то станет ясно, что у животных, чувствительных по локусу Rgv-1, антиген FMR почти полностью исчезает из селезеночных клеток, а у животных, относительно резистентных по своему генотипу Rgv-1, уровень проявления антигена FMR остается высоким.

На основании этого наблюдения можно предположить, что Rgv-1 контролирует чувствительность или резистентность к вирусу путем следующих механизмов: животные с обоими типами Rgv-1 одинаково способны вырабатывать антитела против FMR; однако в одном случае животные H-2^d теряют антиген и, следовательно, антитела не могут защищать животных и становятся бездейственными. С другой стороны, у относительно резистентных животных H-2^b, у которых антиген сохраняет высокий уровень проявления, антитела эффективно убивают опухолевые клетки. Таким образом, чувствительность к болезни, по-видимому, обусловлена потерей специфичности антигена FMR в селезеночных клетках. Можно поставить много вопросов о том, как исчезает этот антиген. Следует ли рассматривать это исчезновение как эквивалент антигенной модуляции? Этот вопрос становится еще более интересным, если обратиться к одному из наших контролей в этой области. Нас несколько удивила эта потеря антигена, поэтому

¹ Строго говоря, животные, различающиеся по Rgv-1, различаются также по соседним локусам. — Прим. ред.

мы предположили, что контролем может послужить нормальный клеточный антиген в той же популяции клеток. Мы решили проследить динамику проявления антигенов H-2 на поверхности селезеночных клеток у этих двух линий мышей одновременно с наблюдением за антигеном FMR. Выяснилось, что антигены, детерминированные концом D комплекса H-2, не изменяются в значительной степени в течение болезни у мышей обеих линий, т. е. они сохраняют свой первоначальный уровень проявления или остаются близкими к нему.

Иначе обстояло дело у обеих линий мышей с антигенами, детерминированными локусом K комплекса H-2. В этом случае мы установили, что антигены селезеночных клеток, контролируемые локусом H-2K в поздней фазе болезни имели такую же проявляемость как и антиген FMR, так как у высокочувствительных животных H-2^d по мере исчезновения антигена FMR примерно с такой же скоростью исчезал также антиген H-2K, в данном случае H-2.31.

У животных H-2^b, у которых антиген FMR сохранял относительно высокий уровень проявления до конца патологического синдрома, антиген H-2K, в данном случае H-2.33, также оставался на высоком уровне проявления. Это по меньшей мере таинственно. У меня нет хорошей гипотезы для объяснений. Можно предположить, что у мышей H-2^d антитела против FMR вызывают образование полюсных колпачков из комплексов антигена FMR и антител, и таким образом FMR удаляется с поверхности клетки. Почему это не происходит у мышей H-2^b непонятно. Если предположить, что такой клиренс антигена FMR по какой-то причине увлекает с собой и антиген H-2.31, то все же вопрос будет решен только отчасти.

Я рассмотрел четыре типа генов, управляющих лейкемогенезом при заражении вирусом Фрейнда. По-видимому, если продолжить эту работу в течение еще нескольких лет, то к этому списку можно будет добавить еще несколько генов, хотя я предполагаю, что мы уже идентифицировали основные гены. Несомненно, имеются некоторые другие гены (которые сейчас изучаются), важные при спонтанном лейкемогенезе и отличающиеся от упомянутых мной. К ним относятся гены, контролирующие проявление эндогенных опухолевых РНК-вирусов типа С, и гены, управляющие проявлением у необработанных мышей антигенов, связанных с вирусом (например, gs-1, GSA и G_{1x}). Пока неизвестно, влияют ли эти гены на чувствительность к комплексу вируса Фрейнда. По-видимому, они играют большую роль при спонтанном лейкозе у мышей.

Я надеюсь, что мое выступление пояснило, что вопрос о генетическом контроле болезни, управляемой отчасти геном, который может быть геном иммунного ответа, весьма сложен. Знакомство с генами иммунного ответа у различных животных является лишь частью информации, которая нам нужна, чтобы прогнозировать чувствительность и резистентность к данному патологическому процессу.

Председатель Allison. Lilli представил нам возможно классический пример того, как с помощью генетического анализа можно исследовать взаимодействие нескольких факторов восприимчивости болезни. Теперь обсуждение этой темы продолжит **Steeves**.

Steeves. Все гены, описанные **Lilli** и контролирующие чувствительность к вирусу лейкоза Фрейнда, ставят очень сложные проблемы перед генетиком. Однако для вирусолога ген Fv-1 представляет особый смысл.

Вы можете припомнить, что аллель Fv-1^b у мышей типа В контролирует резистентность только к N-тропным штаммам вируса мышинного лейкоза. **Lilli** указал также, что резистентность к образованию селезеночных очагов

при заражении вирусом Фрейнда наиболее выражена близ конечной точки разведения СООВ, т. е. титры СООВ, определяемые при нарастающих разведениях, резко снижаются, а не остаются постоянными, отсюда кривая доза—ответ с множественными пиками. Предполагалось, что диапазон хозяев СООВ может определяться вспомогательным вирусом, который естественно сопутствует ему, называемым ЛЛВ-Ф. Предполагается, что ген Fv-1 снижает эффективность N-тропного ЛЛВ-Ф (обычно присутствующего в значительном избытке), что выявляет потребность в множественных контактах с вирусом для инфицирования и образования очагов. Эта трактовка поддерживается данными, полученными в нескольких направлениях. Во-первых, кривые с множественными пиками нельзя объяснить прежде всего снижающейся степенью индуцированной вирусом иммунодепрессии у хозяина при нарастающих разведениях вируса, так как такие же кривые доза—ответ наблюдаются у мышей, у которых иммунодепрессия была предварительно вызвана обработкой кортизолом. Во-вторых, добавление к разведенному вирусу Фрейнда ЛЛВ-Ф, который сам по себе лишен способности вызвать образование селезеночных очагов, превращает кривую с множественными пиками в кривую с одним пиком. Предполагается, что разница между титрами СООВ при данном наблюдении, при добавлении и без добавления вспомогательного вируса характеризует активность в препаратах вспомогательного вируса. Анализ путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы выявляет тесную связь между вспомогательной активностью и частицами, имеющими плотность и морфологию опухолевых РНК-вирусов. Кроме того, эта активность пропорциональна взятой дозе вируса и теряется при инкубации вируса со специфической мышью антисывороткой, направленной против него.

Таким образом, 9-дневная проба на вспомогательную активность у мышей демонстрирует замечательную специфичность. Она выявляет не только лейкозные вирусы у мышей, но и вирусы, лейкемогенные для кошек, кур и индеек. Однако она не выявляет вирусы, содержащие ДНК, или неонкогенные вирусы, содержащие РНК. Поэтому особого внимания требует обнаруженная нами недавно вспомогательная активность 65% экстрактов человеческой селезенки от больных лейкозом, но не выявленная в нормальной человеческой селезенке. Такая активность, обнаруженная при человеческом лейкозе, легко седиментируется и проходит через фильтры в 0,2 мкм, но не образует обособленной полосы при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Даже если вспомогательная активность «человеческого происхождения» не связана с частицами типа С, характерными для лейкемогенных вирусов других млекопитающих, мы собираемся изучить ее возможную роль в качестве этиологического фактора при лейкемогенезе у человека.

Обратимся теперь к другому направлению исследований, возможному благодаря феномену подавления ЛЛВ-Ф геном Fv-1. Недавно мы установили, что можно получить псевдотипы СООВ, если одновременно заражать мышью типа В N-тропным комплексом вируса Фрейнда и NB-тропным вирусом мышинового лейкоза другого происхождения. Последний вирус будет успешно конкурировать с N-тропным ЛЛВ-Ф у мышей типа В, и двух пассажей СООВ обычно достаточно для полного антигенного изменения СООВ (т. е. приобретения новых антигенов и полной потери антигенов, специфических для вирусов Фрейнда). Это изменение сохраняется при последующих пассажах псевдотипа, если к вирусу не добавлен ЛЛВ-Ф, после чего он быстро возвращается к первоначальной форме. Мой аспирант Echneg провел подробный антигенный анализ 9 псевдотипов СООВ, приготовленных

из различных изолятов вируса мышинного лейкоза. Он проследил кинетику их нейтрализации в присутствии мышинных антисывороток против вирусов, индуцирующих лейкозы, и смог разделить 10 обычно используемых вирусов мышинного лейкоза по 5 категорий, различных по антигенности. Пока еще не установлено, соответствует ли эта классификация аналогичному анализу при помощи новой пробы на бляшки ХС для титрования вирусов мышинного лейкоза *in vitro*. Если соответствие будет найдено, то возможно, что соотношения между вирусами мышинного лейкоза значительно более сложны, чем довольно простое предположение Grosse.

Я надеюсь, что мне удалось объяснить, как Fv-1, один из генов, контролирующих чувствительность мышей к вирусам мышинного лейкоза, использовался для изучения соотношений между лейкемогенными вирусами. Пока эти исследования очень мало осветили механизм действия гена Fv-1. Мы должны значительно глубже изучить его для того, чтобы понять каким образом экстракты лейкемических тканей замещают какую-то функцию, подавляемую геном Fv-1.

Председатель Allison. Описание этих моделей генетического контроля чувствительности к болезням в выступлениях Lilly и Steeves открыло перед нами ряд интересных возможностей. Теперь Pincus сообщит о системе ХС.

Pincus. Я занимался главным образом генетическим контролем действия вируса мышинного лейкоза у их естественных хозяев на основании исследований, проведенных в сотрудничестве с Rowe, Hartley и Lilly.

При изучении вирусов мышинного лейкоза возникают серьезные методологические трудности. В течение первых 15 лет после их открытия эти вирусы можно было идентифицировать только на основании лейкемогенеза в качестве конечной точки. Указанный параметр оказался слишком трудоемким и дорогим. Опыты с использованием новых данных можно было начинать только с большими интервалами, продолжительностью в год. В течение последних 7 лет были разработаны пробы *in vitro*, позволяющие обнаружить вирусы мышинного лейкоза через несколько дней или недель. Таким образом, можно было глубже изучить эти вирусы. К этим пробам относятся методы, использующие иммунологические вирусные маркеры при связывании компонента, иммунофлюоресценцию, цитотоксические и другие методы: взвешивание селезенки и подсчет очагов, образуемых эритролейкемическими вирусами, наличие обратной ДНК транскриптазы и образование бляшек на клетках ХС. Известно, конечно, что различные пробы могут выявлять разные параметры, связанные с вирусами или с разными стадиями репликации вирусов. Опыты с тканевыми культурами, которые я опишу, ставились с бляшковой пробой ХС. Опыты *in vivo* были основаны по пробе образования селезеночных очагов вирусом Фрейнда.

Естественная история вирусов мышинного лейкоза у линии мышей с высокой и низкой заболеваемостью и отношение этих вирусов к лейкемогенезу крайне сложны. Вирусы безусловно можно найти в нелейкемических клетках как *in vivo*, так и *in vitro* и при рождении вирус можно обнаружить у животных, которые позднее заболеют лейкозом. У мышей АКР с большой склонностью к лейкозу вирус можно найти, начиная примерно с 17-го дня беременности, и количество его резко увеличивается, начиная от нескольких дней после рождения до 16-го дня жизни. На протяжении всей жизни мышей АКР титр падает с последующим расхождением: у мышей, заболевших лейкозом, наблюдается значительное повышение среднего титра вируса примерно в то время, когда начинается болезнь. Это явление, более подробно изученное Oldstone, возможно, объясняется тем, что образуются иммунные комплексы этого вируса и сам вирус может циркулировать в виде

иммунного комплекса. По-видимому, повышение вирусного титра совпадает с лейкемогенезом, однако пока еще можно только предположить о наличии причинной связи.

ТАБЛИЦА 105

Взаимодействие N-, B- и NB-тропных вирусов с клетками N-типа (NIH) и B-типа (BALB/c)

Хозяин	Титр вируса, log ₁₀		
	N-тропный (AKR)	B-тропный (RAD-LV)	NB-тропный (Rauscher)
NIH	5,0	2,0	6,0
BALB/c	2,0	5,0	6,0

ТАБЛИЦА 106

Образование бляшек различных N-, B- и NB-тропных вирусов в эмбриональных клетках 23 линий мышей

Клетки	H-2	Число тестов	Вирусы		
			N-тропный ^а	B-тропный ^б	NB-тропный ^а
N-тип					
NIH/N	—	10	(100) ^в	0,1	(100) ^в
AKR/N ^г	k	2	200	0,1	250
C58/J ^г	k	1	120	0,1	120
C57BR/CdJ	k	2	100	0,1	100
C57L/S	b	5	100	0,2	100
Ha/ICR	—	1	80	0,5	140
St/BJ	k	2	60	0,2	80
CBA/J	k	2	50	<0,1	100
CE/J	k	2	50	<0,1	100
C3H/HeN	k	3	50	<0,1	60
DBA/2	d	7	40	0,3	100
NZW/N	?	2	15	0,3	100
129/J	b	4	15	<0,1	120
RE/J ^г	k	2	10	<0,1	100
NZB/N	d	7	2	<0,01	30
B-тип					
BALB/c	d	10	0,8	100 ^в	80
A/HeJ	a	1	0,3	80	40
AL/N	a	2	0,3	60	40
B10.BR/J ^г	k	2	0,3	60	50
I	l	1	0,1	50	HT
C57BL/10J	b	3	0,2	30	40
A/J	a	6	0,4	25	80
C57BL/6N	b	7	0,3	25	50

^а Образование бляшек в фибробластах эмбрионов (МЭ) мышей NIH.

^б Образование бляшек относительно BALB/c МЭ.

^в Предположительно.

^г Первичные МЭ-клетки использовались как вторичные МЭ, в которых развивались спонтанные бляшки.

HT — не тестировалось.

Несколько лет назад Hartley, Rowe и Huebner приступили к разработке методов для выделения вирусов лейкоза от их естественных хозяев. Опыты ставились на фибробластах эмбрионов мышей Swiss (Национального института здравоохранения) или мышей BALB/c. Было сделано важное наблюдение о том, что все натуральные вирусы мышинного лейкоза избирательно размножались либо в клетках мышей Swiss, либо в клетках BALB/c, но не в клетках обеих линий (табл. 105). Таким образом, натуральные вирусы можно было разделить на две группы: N-тропные, с эффективностью роста в 100—1000 раз больше в клетках мышей Swiss, чем в клетках мышей BALB/c, и В-тропные вирусы с обратной закономерностью. Стоит подчеркнуть, что от линии BALB/c были выделены как N-тропные, так и В-тропные вирусы. Пока все вирусы, выделенные от подверженных лейкозу линий AKR и C58, оказались N-тропными. Иногда можно адаптировать N-тропные или В-тропные вирусы к росту на обоих типах клеток, путем форсированного пассажа через резистентные клетки. Такие вирусы называются NB-тропными. Некоторые выращенные в лаборатории вирусы мышинного лейкоза, например, вирус Moloney и Rauscher обладают В-тропизмом. Никогда не удавалось N-тропный вирус прямо превратить в В-тропный, за исключением сложных опытов с транскрипцией.

Под влиянием работ McDevitt и Sela по генетическому контролю иммунного ответа, очевидно, сцепленного с комплексом H-2, а также работ Lilly, который изучал сцепленный с H-2 локус Rgv-1 в смысле чувствительности к вирусу лейкоза Gross, мы решили изучить возможную генетическую основу N-тропизма и В-тропизма.

Ряд титрований с многими N- и В-тропными вирусами, полученными от различных линий мышей и мышинных опухолей, показал, что все исследованные мышинные линии напоминали либо мышей Национального института здравоохранения, либо BALB/c (табл. 106). Линии с чувствительностью к N-тропным вирусам в 100—1000 раз более высокой, получили название линий N-типа. Все другие линии с обратным соотношением чувствительности получили название линий В-типа. Надо подчеркнуть, что внутри этих широких категорий наблюдаются значительные различия. Интересным примером является линия NZB, относительно нечувствительная к обоим типам, но более чувствительная к N-тропным вирусам, таким образом, ее можно отнести к N-типу. Как вам известно, у этой линии наблюдаются аутоиммунные явления, и вирусология мышинного лейкоза у нее весьма своеобразна. NZB — это единственная линия, у которой можно найти вирусный антиген, но при бляшковой пробе ХС активность *in vitro* не проявляется. Далее, это единственная линия, у которой как вирусный антиген, так и антитела можно обнаружить у одного и того же хозяина на протяжении его жизни. Следует отметить, что были также другие различия, например, между мышами Национального института здравоохранения и DBA, а также BALB/c и A и C57BL. Тем не менее общее деление на линии N- и В-типов правомерно.

Обозначение d в табл. 106 указывает на присутствие спонтанного вируса во вторичных препаратах тканевых культур. К этим линиям относятся линии AKR и C58, склонные к лейкозам, а также линии RF и B10.BR. Мыши B10.BR(H-2)^{k/k} конгенны с мышами линии C57BL(H-2^{b/b}), у которой вирус можно «активировать» облучением. Интересно, что если гаплогенотип H-2 вводится в генетическую основу C57BL, чтобы получить линию B10.BR, то у некоторого процента таких мышей наблюдается присутствие спонтанного лейкемического вируса. Все линии, у которых во вторичных

культурах фибробластов имеется значительное количество спонтанного лейкемического вируса имеют гаплотп Н-2^к. Однако между Н-2 и типом N или В мышинных линий сцепления нет. В обеих категориях представлены Н-2, b, d и k.

Вкратце остановлюсь на данных, показывающих, что типы N и В детерминируются генетически. Гибриды F₁ мышей типов N и В резистентны как к N-тропным, так и к В-тропным вирусам. Резистентность, по-видимому, связана с кинетикой двух попаданий как у гибридов F₁, так и у резистентных линий. Таким образом, мы располагаем, только измеренным титром в определенной точке при тестировании эффективности образования бляшек в монослоях нечувствительных эмбриональных клеток.

В опытах с возвратным скрещиванием (табл. 107) мышей можно было разделить на два типа: а) животные с титром N-тропного или В-тропного вируса, таким же, как у родительской линии при значительно сниженном титре другого вируса, б) животные с одинаковыми, но сниженными в 30—100 раз титрами как N-тропных, так и В-тропных вирусов по сравнению с соответствующей чувствительной линией. Эти два типа чувствительности названы соответственно гомозиготным и гетерозиготным. В табл. 107 приведены результаты скрещивания 12 пар, обнаружено 48 гомозиготных и 52 гетерозиготных эмбриона, что соответствует ожидаемому отношению 1:1, если расщепляется один ген. Следует отметить, что данные для мышей, по-

ТАБЛИЦА 107

Классификация потомства BC₁ 12 матерей с помощью титрования бляшек на культурах клеток от отдельных эмбрионов

N-B тип	Скрещивание	Число эмбрионов в помете	Генотип	
			гомозиготы	гетерозиготы
N×(B×N)F ₁	DBA/2N×CDF ₁	9	NN 3	NB 6
	C57L/J×CF ₁	9	7	2
	C57L/J×CLF ₁	10	8	2
	C57BR/cd J×CLF ₁	6	3	3
	Всего	34	21	13
(B×N)F ₁ ×N	CDF ₁ ×DBA/2N	8	2	6
	CDF ₁ ×C57L/J	9	3	6
	CDF ₁ ×C57L/J	7	2	5
	CDF ₁ ×C57BR/cdJ	11	7	4
	Всего	35	14	21
B×(B×N)F ₁	BALB/c×CDF ₁	9	1	8
	BALB/c×CLF ₁	8	4	4
	Всего	17	5	12
(B×N)F ₁ ×B	CDF ₁ ×BALB/cN	9	6	3
	CLF ₁ ×BALB/cN	5	2	3
	Всего	14	8	6
	Общее количество всех эмбрионов	100	48	52

лученных при возвратном скрещивании, были не столь отчетливы, как для родительской чувствительной и резистентной линии. Очевидно, чувствительность зависит и от других факторов, помимо рассматриваемого нами локуса. Однако для определения гомозигот и гетерозигот были использованы строгие критерии и все эмбрионы были явно сходны с родительским чувствительным типом или резистентным типом F_1 .

Знакомясь с литературой, мы убедились, что наши наблюдения по локусу NB сходны с данными Lilly по локусу, названному Fv-1, в отношении чувствительности к вирусу Фрейнда. Локус NB изучался при помощи культивирования ткани *in vitro*, тогда как локус Fv-1 был описан в опытах с пробой *in vivo* на селезеночные очаги. Вместе с Rowe и Lilli мы решили обменяться реагентами и мышами, чтобы установить, являются ли идентичными генетически локусы NB и Fv-1. Таким образом, два варианта вируса Фрейнда, использованные для выявления локуса Fv-1, были испытаны в тканевых культурах. Как и следовало ожидать, вариант F-S вируса Фрейнда оказался N-тропным вирусом, который плохо размножался у линий типа B, тогда как вариант F-B (растущий у всех мышей после адаптации) является NB-тропным вирусом (табл. 108). Дальнейшие исследования с линиями,

ТАБЛИЦА 108

Титры (\log_{10}) вариантов вируса Фрейнда на мышинных эмбриональных клетках

N-B-тип	Клетки	F-S (N-тропный)	F-B (NB-тропный)
N (Fv-1 ^s)	NIH	5,5	5,0
	DBA/2N	5,8	5,4
	C3H/HeN	5,6	5,3
	C57L/I	5,7	5,5
	NZB/N	5,2	5,0
B (Fv-1 ^r)	BALB/cN	3,1	5,5
	A/J	2,8	5,1
	C57BL/6	2,2	5,3
F_1	(C57/L × BALB) F_1	3,0	5,6
	(BALB × DBA) F_1	2,5	5,2

выведенными Lilly, которые конгенны по локусу Fv-1 (а также по локусу Fv-2, что не имеет прямого отношения к чувствительности в тканевых культурах и здесь не рассматривается), показали, что линия D-2KB, чувствительная по Fv-1, была подобна линии типа N, а линия D-2RS, резистентная по локусу Fv-1, была подобна линии типа B. Наконец, зная тип Fv-1, установленный при помощи опытов с тканевыми культурами и бляшковой пробы ХС, мы пытались предсказать ответ образования селезеночных очагов у ранее нетипированных линий. Все прогнозы в отношении ответа на F-S и F-B подтвердились. Эти опыты показали, что локус NB и локус Fv-1 идентичны или очень тесно сцеплены. Очевидно, надо было создать новую номенклатуру для обозначения аллелей Fv-1. Вместо обозначений s (чувствительный) и r (резистентный) лучше пользоваться обозначениями n (N-тип) и b (B-тип) (табл. 109). При обозначении аллелей доминирование резистентности обозначается строчными буквами.

Мы признаем, что эти исследования имеют отношение к вирусологии и генетике, но какое отношение они имеют к лейкозу? Результаты исследо-

вания пока еще нет, Rowe проводит большой опыт для изучения связи между локусом Fv-1, и проявлением натуральных вирусов и лейкемогенезом у мышей. Однако литературные данные о диапазоне хозяев указывают на возможную роль Fv-1 при спонтанном лейкемогенезе. Данные, приведенные в табл. 110, получены Gross при исследовании диапазона хозяев с пассиро-

ТАБЛИЦА 109

Корреляция между генотипом
Fv-1 и N-и В-тропизмом

$$Fv-1^s = Fv-1^n$$

$$Fv-1^r = Fv-1^b$$

ТАБЛИЦА 110

Корреляция чувствительности к вирусу лейкемии с типом Fv-1

Fv-1	H-2	Мышь	Лейкемия, %		
			пассаж А	RAD-лейкемогенный вирус	вирус В/Т-L
N	b	C57L	—	—	0
	d	DBA/2	—	—	8
	k	C3H/B1	98	27	—
	k	C57Br	94	—	9
B	q	DBA/1	—	—	18
	a	A	11	—	100
	b	C57BL/6	—	91	68
	b	C57BL/10	—	89	80
	d	BALB/c	—	71	100
	i	I	22	—	—

ванным вирусом А, Kaplan с вирусом Rad-LV и Tennant вирусом В/Т-L. Исследованные линии мышей разделены по типу «NB» или Fv-1 вместо классификаций, принятых этими авторами задолго до открытия локуса Fv-1. По-видимому, можно заключить, что пассированный вирус А является N-тропным вирусом (полученным от мышей AKR, N-типа), а вирусы Rad-LV и В/Т-L — В-тропными (они получены соответственно от линий C57BL и BALB/c В-типа). Между линиями двух групп наблюдается значительное различие, что подтверждает нашу мысль о многофакторном характере чувствительности хозяев к лейкемогенезу. Действительно Lilly и Tennant доказали значение детерминант, сцепленных с H-2, для чувствительности к лейкозу, как упоминалось ранее. Однако основной детерминантой лейкемогенеза, видимо, является локус Fv-1, как видно из табл. 110, хотя это положение надо еще подтвердить теми перспективными исследованиями, которые ведутся.

Wagner. Может ли Lilli сказать, действует ли Rgv-1 подобно гену иммунного ответа? Он заметил, что между чувствительными и резистентными линиями по Rgv-1 разница по образованию гуморальных антител очень невелика. Мы получили в своей лаборатории данные в работе с плазмоцитомами, вероятно, связанными с антигеном вируса Gross, которые показывают, что опухолевый иммунитет *in vivo* опосредован клеткой, несущей θ -антиген, т. е. Т-клеткой. Есть ли разница по Т-клеточному иммунитету у линий, чувствительных и резистентных по Rgv-1?

Lilly. У нас нет данных по этому вопросу. В лабораториях Levy, а также Bianchi в Италии получены данные, позволяющие предполагать, что с генотипом Rgv-1, совершенно не решен.

Wach. Хочет ли Lilly сказать, что Rgv-1 не может быть рецептором потому, что эффект его является частичным или количественным, а не качественным.

Lilly. Да.

Wach. Я не думаю, что это решающий довод. Мне кажется, что мутация детерминанты рецептора может привести к уменьшению аффинитета, ко всевозможным изменениям, которые приведут к количественной разнице.

Lilly. Количественный эффект, о котором я говорил в связи с Rgv-1, проявляется на уровне разницы в 10—20 раз в поздней стадии патологического процесса. Однако в системах, допускающих наблюдения в ранней стадии болезни, количественная разница между двумя хозяевами незначительная, безусловно не больше чем двукратная.

Например, животные, чувствительные к вирусу Фрейнда и различающиеся только по Rgv-1, крайне чувствительны к образованию очагов вирусом, и есть основания полагать, что образование очагов является важным фактором в развитии патологического синдрома. У таких животных результаты подсчета селезеночных очагов через 9 дней после инокуляции вируса показывают только двукратную разницу. Мне кажется, этого недостаточно для того, чтобы предполагать, наличие разницы рецепторов, особенно, если разница спустя всего лишь несколько дней, согласно ряду других критериев, резко возрастает. У хозяев, чувствительных по Rgv-1, при пробе на селезеночные очаги можно найти вирусный титр около 10^5 , тогда как у резистентных хозяев титр равен $0,5 \times 10^5$. Думаю, что это говорит против рецепторной гипотезы, но возражение Wach отчасти справедливо. В конечном счете аффинитет рецепторной молекулы может усилить эффект в поздней стадии болезни.

Pincus. Я думаю, что доминантный характер резистентности по этому локусу также говорит против гипотезы рецептора.

Wodmer. Я хотел бы задать Lilly вопрос в связи с его очень интересным наблюдением о том, как изменяются антигены Н-2 на протяжении болезни, связанной с геном Rgv-1. Это наблюдение ставит перед нами ряд вопросов, которые, как он отметил, могут прояснить происходящие явления.

Главный вопрос такой: какие типы клеток изучает Lilly в отношении антигенов Н-2? Далее, пользуется ли он цитотоксическим тестом и проверял ли он изменения по абсорбции и в прямой пробе? Можно ли допустить, что изучаемые клетки действительно являются опухолевыми и что изменения связаны с общими изменениями этих клеток во время опухолевого роста, а, следовательно, не связаны прямо с антигеном Н-2? Например, типирование по Нв-А иногда дает разные результаты у больных и были описаны изменения типов НL-A на лимфоидных клетках. Кроме того, антигены НL-A нельзя обнаружить на клетках HeLa прямым типированием, так же как и Н-2 на опухолевых клетках, например клетках асцитной опухоли Эрлиха. Антигены НL-A нельзя обнаружить на гранулоцитах по прямой цитотоксичности, хотя тесты с абсорбцией указывают на их присутствие. Следовательно, мне кажется важным продолжить изучение изменений Н-2, связанных с Rgv-1, и попытаться установить характер изменения антигенов Н-2, которые, возможно, осветят функцию гена Rgv-1.

Lilly. Мы изучали исчезновение антигенов FMR и Н-2.31 при помощи различных методик, включая абсорбцию. Конечно, ни один из этих методов

не исключает того, что мы имеем перед собой не исчезновение антигенов в собственном смысле слова, а блокирование антигена, посредством какого-то механизма.

Председатель Allison. Безусловно интересно специфическое влияние на какой-то один антиген H-2, но не на другой.

Lilly. Да, оно специфично для генотипа. Аналогичный антиген у резистентных животных не исчезает.

Председатель Allison. Происходит ли что-нибудь подобное у человека?

Lilly. Возможно, но мы не знаем.

Van Rood. Насколько мне известно, имеются только два доказанных наблюдения в той связи, о которой говорит Bodmer. Одно исследование проведено Amos, а другое — Vertrams. Случай Amos был, насколько мне известно, проверен абсорбцией. Случай Vertrams не был проведен. В случае Vertrams интересно отметить, что специфичность 4a сохранилась, а остальные специфичности исчезли.

Lilly. Был ли при этом сопутствующий патологический синдром?

Van Rood. Это были больные в поздней стадии лимфогранулематоза.

Bodmer. Я хотел бы получить ответ на мои остальные вопросы.

Lilly. Что касается типа клеток, то мы изучали почти исключительно клетки селезенки. В самой ранней стадии болезни, конечно, исследуется вся смешанная популяция селезеночных клеток. Однако вскоре после того, как начинается быстрое увеличение селезенки, она содержит в основном моноклональную популяцию зараженных вирусом опухолевых клеток. Таким образом, мы изучаем относительно гомогенную популяцию клеток — клетки ранней фазы эритроидного роста, часто называемые эритроблестами.

Bodmer. Это клетки опухоли?

Lilly. Да, это клетки опухоли.

Bodmer. Если я правильно понял слова Lilly, именно опухолевые клетки в одном случае теряют данный антиген, а в другом случае не теряют его.

Lilly. Да, насколько мне известно, опухолевые клетки — это единственные клетки, на которых проявляется специфический для опухоли антиген FMR. Насколько нам известно, лимфоциты тех же хозяев не проявляют антигена FMR. Таким образом, мы вынуждены изучать только опухолевые клетки. Могу также сказать, что предварительные и, возможно, неполные исследования позволяют думать, что, когда из опухолевых клеток исчезает антиген H-2.31 в поздней стадии болезни, эти антигены не исчезают одновременно из лимфоцитов.

Raff. Пытался ли Lilly модулировать антигены FMR in vitro?

Lilly. Нет.

Председатель Allison. По-видимому, при лимфоцитарном хориоменингите исчезновение вирусспецифического антигена с поверхности зараженных клеток может быть интересным и важным явлением, согласно недавним наблюдениям Lehmann-Grubbe. Желает ли кто-нибудь высказаться об этом?

Bodmer. Я хотел бы сделать еще одно замечание по вопросу о типировании разных клеток, так как считаю это важным. Некоторые наши наблюдения позволяют думать, что в известных ситуациях теряются антигены LA, а не антигены FOUR в системе HL-A согласно прямому типированию. Мы исследовали гибридные клетки, полученные нами и другими исследователями между клетками HeLa, на которых антигены HL-A не выявляются и лимфоцитами или фибробластами периферической крови, на которых они выявляются. У гибридов обычно можно обнаружить типы HL-A только лим-

фоцитов или фибробластов. Однако мы установили, что антигены LA могут проявиться значительно слабее, чем антигены FOUR.

Поэтому я полагаю, что аналогичное изменение на опухолевых клетках может быть относительно неспецифическим, отражающим только какой-то аспект опухолевого роста, так как, очевидно, у чувствительных животных опухоль растет иначе и более вирулентна.

Benasegga. Здесь обсуждался Rgv-1 и механизм действия тканевой совместимости, сцепленной с H-2. Однако я хочу задать вопрос: был ли когда-нибудь обнаружен иммунитет к антигену вируса лейкоза Фрейнда? Если это так, то при предварительной обработке облученными изогенными опухолевыми клетками в этой системе, очевидно, можно выявить какую-то форму иммунитета. Тогда можно было бы установить, слабее ли иммунитет у линий, чувствительных к лейкозу, чем у нечувствительных. Иначе говоря, может ли тимэктомия или антилимфоцитарная сыворотка снять разницу между линиями?

Lilly. Тимэктомия несомненно увеличивает чувствительность к болезни вируса Фрейнда. Пока еще наши исследования не дают нам основания сказать, что тимэктомия снимает разницу, детерминируемую Rgv-1, так как обе линии более чувствительны после неонатальной тимэктомии. Есть основания полагать, что образование антител против FMR, т. е. гуморальный ответ на специфический для опухоли антиген, действительно играет роль при резистентности к вирусу Фрейнда и ко всем другим лейкозным вирусам. Как я упомянул, отвечая на вопрос Wagner, указания на клеточный иммунитет как фактор, определяющий резистентность к болезни, безусловно менее доказательны, но все же весьма интересны. Опыты, подсказанные Benasegga, стоило бы поставить.

Benasegga. Пытался ли кто-либо проследить за индукцией болезни при перевивке трансформированных клеток у этих животных, несущих антиген облученный или в таком малом количестве, чтобы ослабить иммунитет в других системах?

Lilly. По-видимому, подобных исследований этого рода не проводилось.

Benasegga. Очень жаль.

Председатель Allison. Теперь Oldstone расскажет нам о двух моделях, в которых развитие болезни зависит от иммунного ответа хозяина.

Oldstone. Вначале я буду рассматривать инфекцию, вызванную вирусом лимфоцитарного хориоменингита (ЛХ) у мышей, а затем аутоиммунную болезнь новозеландских мышей.

Сначала я расскажу об острой болезни, вызываемой вирусом ЛХ у взрослых мышей. При введении вируса ЛХ мышам наблюдается картина, сходная с очень острой вирусной инфекцией, т. е. в зависимости от вирулентности и дозы вируса, а также чувствительности мыши; животное умирает от инфекции в острой фазе с изменениями преимущественно в сосудистом сплетении, мозге, печени и сердце или же ткани очищаются от вируса, и животное становится иммунным. Летальный исход зависит от иммунного ответа хозяина к инфицирующему вирусу. Получены следующие данные:

- 1) ЛХ как таковой не цитотоксичен. Когда этот вирус выращивается *in vitro* в тканевой культуре, цитотоксического эффекта не наблюдается;
- 2) когда животному вводят обычную летальную дозу вируса, если использованы какие-то иммунодепрессанты (АЛС, облучение рентгеновыми лучами, метотрексат, неонатальная тимэктомия), то животное предохраняется от обычного летального исхода острой вирусной болезни.

3) если добавить к клеткам, зараженным вирусом, иммунные сыворотки и комплемент или сенсibilизированные клетки, то зараженные клетки повреждаются.

Таким образом, есть много указаний на то, что эта острая вирусная болезнь вызвана не самим вирусом, а взаимодействием между иммунным ответом хозяина и вирусом.

Рассматривая чувствительность и резистентность в этой модели, я не буду останавливаться на таких неспецифических факторах, как интерферон, температура тела, гормоны и т. д., несомненно играющие роль при любой инфекции. Я остановлюсь лишь на иммунном ответе при инфекции ЛХ.

Когда мы впервые обратились к той модели, вскоре стало ясно, что некоторые линии высокочувствительны, а другие резистентны к заражению вирусом ЛХ. Поскольку болезнь вызывается иммунным ответом на вирус, возникает вопрос: сцеплен ли этот ответ с H-2? Чтобы решить этот вопрос, мы изучили несколько линий, но я буду говорить только о двух: SWR/J, имеющей генотип H-2^{q/q}, и C3H/J с генотипом H-2^{k/k}. Линия SWR/J оказалась более чувствительной, а линия C3H/J — более резистентной. Возникает вопрос: какой будет чувствительность у гибридов F₁(SWR/J и C3H) и после возвратного скрещивания с родительскими линиями? Если анти-вирусный иммунный ответ или ответы, убивающие животное, сцеплены с H-2, то, очевидно, любое животное, несущее аллели H-2^q, должно быть чувствительным, а животные, гомозиготные по H-2^k, должны быть резистентными.

Продолжим эту мысль. Потомство от возвратного скрещивания мышей H-2^{q/k} F₁ с чувствительной линией должно быть чувствительным, а потомство от возвратного скрещивания с резистентной линией должно расщепляться на чувствительных и резистентных особей. Опыты, отраженные в табл. 111 и 112, были проведены совместно с McDevitt и Mitchell. Для опытов были взяты животные, типированные по H-2, а затем им вводили в мозг вирус ЛХ. Конечной точкой считалась смерть от лептоменингита. При этом установлены в основном следующие данные. Если вводить животным в нулевой день летальное количество вируса, то около 1/3 или 1/2 чувствительных животных начинают умирать на 6-й или 7-й день, и обычно все животные погибают через 2 нед.

ТАБЛИЦА 111

Связь аллелей k и q H-2 с чувствительностью к острой ЛХ-вирусной инфекции

Линия	H-2	Острая ЛХ-вирусная инфекция	
		чувствительность	резистентность
SWR/J	qq	+	+
C3H	kk		+
(SWR/J × C3H)F ₁	qk	+	
(F ₁ × SWR)BC ₁	qq	+	
	qk	+	
(F ₁ × C3H)BC ₁	qk	+	
	kk		+

Как видно из табл. 111, потомство от возвратного скрещивания или гибридные мыши, несущие хотя бы один аллель H-2^q, погибали, напротив, мыши C3H и потомство от возвратного скрещивания, гомозиготное по H-2^k,

выживали и все еще живы. С другой стороны, мыши $F_1 \times C3H$, несущие один аллель $H-2^q$, все умерли.

В следующем опыте изучались различия между конгенными линиями, полученными от Shreffler. Это были мыши $C3H(H-2^k)$ и $C3H.Q(H-2^q)$. Мыши $H-2^q$ были значительно более чувствительны после введения вируса, чем конгенные мыши $C3H(H-2^k)$ (табл. 112).

ТАБЛИЦА 112
Связь аллелей k и q $H-2$ с чувствительностью к острой ЛХ-вирусной инфекции

Конгенная линия	$H-2$	LD_{50}^a
$C3H$	kk	4,3
$C3H.Q/SF$	qq	5,7

^a Эквивалентно \log разведения, необходимого для умерщвления 50% животных. Различия на 1 \log и более являются значимыми. Титры даны со штаммом ЛХ-вирусов, пассированных через мышинные L-клетки.

Я хочу сказать, что мы нашли положительную корреляцию между гаплотипом $H-2$ и чувствительностью к заражению вирусом ЛХ.

Далее естественно возникает вопрос: чем обусловлена эта чувствительность, сцепленная с $H-2$? В табл. 113, я перечислил три основных объяснения. Возможно, во-первых, что $H-2$ детерминирует рецепторы для прикрепления вируса. Если это так, то, очевидно, наиболее чувствительные животные ($H-2^q/q$) должны абсорбировать больше вируса на клеточной поверхности, чем резистентные животные ($H-2^k/k$). Это можно проверить в эксперименте. Мы использовали культивированные фибробласты от мышей $C3H.Q$ или $C3H$, добавляли к ним вирус, выжидали в течение 1 ч, чтобы состоялась абсорбция, а потом измеряли количество вируса, абсорбированного различными по $H-2$ клетками. Результаты показали, что между количеством вируса, абсорбированного на клетках мышей $C3H$ или $C3H.Q$, нет разницы. Следовательно, мы можем отбросить предположение, что чувствительность, сцепленная с $H-2$, объясняется рецепторами $H-2$ для прикрепления вируса.

ТАБЛИЦА 113
Постулированная связь между антигенами гистосовместимости и чувствительностью к вирусной инфекции

1. Наличие рецепторных участков для прикрепления вируса
2. Участие антигенных детерминант
3. Генетический контроль специфического иммунного ответа (1 ч ген)

Согласно второй гипотезе, $H-2$ и вирусный антиген имеют общие антигенные детерминанты. Эта гипотеза предполагает, что хозяин неспособен к иммунологической реакции против вируса. Однако это не так: у гибридов F_1 наблюдается как гуморальный, так и клеточный ответ против вируса. Таким образом, вторая гипотеза, по-видимому, отпадает.

Третья из основных гипотез предполагает, что смерть связана с геном иммунного ответа $Ig-1$. У нас нет прямых экспериментальных данных, чтобы поддержать или отбросить эту теорию, но не прямые данные ее подтверждают.

дают. Можно заметить, что количество вируса на плазматической мембране у мышей Н-2^а больше, чем у мышей Н-2^к. Вирус или вирусный антиген, таким образом, находится в таком положении, что иммунные клетки или антитела легче поражают его.

Далее интересно отметить, что можно вызвать хроническую прогрессирующую «аутоиммунную болезнь» с помощью вируса ЛХ у животных, которым вирус вводится при рождении или естественно зараженных от родителей *in utero*.

Как видно из табл. 114, линия SWR/J опять-таки чувствительна, и у нее появляются симптомы хронической вирусной инфекции, тогда как линия СЗН довольно резистентна. Признаками хронической болезни являются опосредованные иммунными комплексами гломерулонефрит, васкулит и очаговое повреждение ткани печени, мозга и других тканей. Повреждение тканей опосредовано иммунным ответом хозяина против вируса. В основном это доказывается следующим.

1. Вирус нецитопатогенен в культивируемых клетках.
2. Несмотря на то что вирус растет во всех или почти во всех тканях, у хронически зараженных животных повреждения наблюдаются только в очагах или в избирательных участках.

ТАБЛИЦА 114

Хроническая заболеваемость у мышей с персистирующей ЛХ-вирусной инфекцией^а

3 мес	Н-2	Процент заболевших
SWR/J	qq	100
B10.D2 старые	dd	0
СЗН	kk	0
12 мес		
SWR/J	qq	100
B10.D2 старые	dd	90
СЗН	kk	0

^а Хроническая болезнь заключается в опосредованных иммунными комплексами гломерулонефритах, артериитах и фокальных некрозах в различных тканях. Мышам вирус вводился вскоре после рождения.

3. У хронически инфицированных животных можно обнаружить иммунный ответ, как клеточный, так и гуморальный.

4. Парабиоз между хронически инфицированными животными и иммунными животными или перенос иммунных клеток или иммунных сывороток хронически инфицированным мышам ведет к появлению или усилению поражений от хронической болезни. На основании собранных данных совершенно ясно, что это повреждение действительно обусловлено иммунным ответом хозяина.

В клубочках почек таких мышей можно найти противовирусные антитела. Такие антитела, по-видимому, циркулируют в комплексе с вирусом ЛХ. Ясно, что в клубочках почек мышей SWR/J имеется массивное отложение IgG в 10—15 раз больше, чем количество IgG в клубочках почек мышей СЗН.

В табл. 115 показана судьба мышей СЗН.Q, зараженных при рождении вирусом ЛХ. Эти мыши весьма чувствительны, и более 85% погибает к воз-

ТАБЛИЦА 115
 Выживание в течение 1 мес мышей СЗН.О, зараженных
 ЛХ-вирусом при рождении

СЗН.О	Смертность, %			
	1 нед	2 нед	3 нед	4 нед
	18	44	74	83

расту 1 мес. Фактическая причина их смерти все еще неизвестна. Конечно, интересно, что смерть их наступает в то время, когда у мышат начинает развиваться собственный иммунный ответ. Кроме того, несмотря на выкармливание одной и той же матерью, мышата СЗН.О, зараженные при рождении, значительно меньше, чем незараженные контрольные животные того же помета. Мы пока не нашли патологоанатомических объяснений судьбы зараженных животных.

Упапе. Группа в университете Гопкинса доказала недавно, что клеточный иммунитет является важным, если не важнейшим компонентом при острой болезни ЛХ. В опытах с переносом эти исследования установили, что медиаторами болезни являются θ -положительные клетки. Может ли Oldstone сделать вывод, что эта сцепленная с Н-2 чувствительность к ЛХ просто служит проявлением иммунного ответа Т-клеток у зараженных животных?

Oldstone. Да, Хотелось бы сделать такой вывод. Однако данные, полученные Gildea, Cole и Nathanson в университете Гопкинса, о которых говорит Упапе, не столь ясны, основаны на использовании гетерологичной анти- θ -сыворотки и поэтому могут вызвать возражения. Конечно, хотелось бы думать, что эффект, сцепленный с Н-2, обусловлен иммунным ответом, опосредованным Т-клетками.

Упапе. Мне кажется ясным, что это иммунная реакция, переносимая с клетками, а не с антителами. К тому же контрольные опыты также прямо показывают, что это θ -положительная клетка.

Oldstone. Если Упапе хочет поспорить по этому вопросу, то я охотно иду ему навстречу. Во-первых, были использованы гетерологичные анти- θ -сыворотки, не вполне охарактеризованные или абсорбированные. Если присутствуют антитела против аллотипа, то как мы можем быть уверены, что не убиваем лимфоциты, имеющие на поверхности иммуноглобулиновые рецепторы? Как можно исключить здесь модель, подобную модели Региттапп, где несенсибилизированными лимфоцитами убивают клетки-мишени, покрытые антителами?

Далее, во-вторых, в опытах Gildea и соавт. моделью служили животные, получавшие иммунодепрессант циклосфамид, действие которого на этот специфический противовирусный иммунный ответ не установлено. В-третьих, эта модель весьма отличается от того, что обычно происходит при острой инфекции. У животных, обработанных циклофосфамидом, антиген концентрируется почти полностью в центральной нервной системе (ЦНС), тогда как при острой инфекции ЛХ вирус находится во всех тканях. Самой интересной особенностью модели Gildea—Cole—Nathanson является то, что они обнаружили признаки острой болезни ЦНС после переноса сенсибилизированных клеток. Модель их мне нравится, но я не вполне уверен в справедливости их выводов и мнения Упапе.

Sela. Я хочу убедиться, что правильно разбираюсь в обсуждаемой нами иммунологической системе. Когда мы говорим о чувствительных и резистентных животных, надо ли полагать, что чувствительные животные имеют сильный иммунный ответ независимо от того, будет ли он гуморальным или клеточным? Связана ли болезнь с иммунным ответом или клеточным, иммунный ответ, как и образование антител, играет защитную роль. Я не совсем разбираюсь в корреляциях, предполагаемых между болезнью и иммунным ответом: что с чем коррелирует?

Сначала мне показалось, со слов Oldstone, что чувствительные животные вырабатывают антитела, последние образуют комплексы и эти комплексы индуцируют болезнь. Таким образом, вопрос должен стоять так: образуются ли антитела у резистентных животных? Короче говоря, какова корреляция между болезнью и генетическим контролем иммунного ответа?

Oldstone. Sela спрашивает, убивает ли этих животных иммунный ответ на вирус?

Sela. Да.

Oldstone. Я отвечу утвердительно. Некоторые вопросы, заданные Sela, весьма уместны, но сейчас на них очень трудно ответить. Нефрит и артериит при хронических инфекциях ЛХ, несомненно, объясняются повреждениями, опосредованными иммунными комплексами. На мой взгляд, в этом нет причин сомневаться.

У мышей СЗН(Н-2^k) и SWR/J(Н-2^q) развиваются как гуморальный, так и клеточный ответ на вирус. Следует помнить, что у животных постоянно имеется избыток вируса (или антигена). Количественно измерять антитела при избытке антигена мы пока не можем.

Острые признаки повреждения ткани находятся преимущественно в ЦНС, печени и сердце. Есть основания полагать, что они отчасти вызываются, как отметил Унапие, клеточным иммунным ответом на вирус. Однако возможно, что играет роль также гуморальный ответ против вируса, так как истощение комплемента у животных, остро зараженных вирусом ЛХ, защищает их. Относительная роль Т- и В-клеток не установлена, но я думаю, что имеют значение и те и другие.

Cohn. Определял Oldstone, образуются ли у животных по мере прогрессирования болезни аутоиммунные антитела к нормальным тканям?

Oldstone. Да, мы изучали этот вопрос и я расскажу о результатах позднее. Достаточно сейчас сказать, что такие проявления аутоиммунитета, как антитела против эритроцитов и антиядерные антитела, не наблюдаются у линий СЗН и SWR/J, у старой линии В10.Д2 и у новой линии В10.Д2. Антиядерные антитела вырабатываются у новозеландских мышей, хронически инфицированных вирусом ЛХ. Hotchip нашел противомозговые антитела, но мы не смогли подтвердить его данные.

Levine. Насколько я понимаю мысли Oldstone об острой болезни, он утверждает, что можно выделить фактор, который, по его мнению, необходим, но еще недостаточен для летального исхода, а именно иммунную реактивность мыши к вирусным антигенам. Эта реактивность коррелирует с Н-2. В этом вопросе есть что-то не совсем понятное, но удивляющее меня. Например, мы установили при изучении корреляции между белковыми иммуногенами и Н-2 значительный эффект дозы. Если доза антигена снижена до минимума, едва вызывающего ответ, то мы видим корреляцию Н-2 с реактивностью. С другой стороны, если пользоваться высокими дозами иммуногена, то корреляцию эту все труднее обнаружить, и иногда она скрывается. Что касается вирусов, то по всей вероятности, это сложный иммуноген.

Таким образом, высокие дозы антигена должны ликвидировать эти различия, и эффект, коррелирующий с Н-2, должен исчезнуть. Меня удивляет, что корреляция с Н-2 настолько отчетлива. Несомненно, должны быть какие-то линии Н-2^k, у которых острая болезнь развивается. Может быть Oldstone ответит на эти замечания.

Oldstone. Я могу ответить Levine, только основываясь на имеющихся фактах. При изучении комбинации Н-2^{q/k} у гибридов и потомства возвратного скрещивания мы убедились, что защищены только мыши, гомозиготные по Н-2^{k/k}. Степень защиты, кроме того, относительна, так как некоторые животные умирают, примерно около 30% животных Н-2^{k/k}. Мы, несомненно, применяли ограниченную дозу вируса, так как она убивает не всех животных.

Sela. Levine, очевидно, хочет сказать, что, если воспользоваться белком, несущим многие детерминанты, то можно обнаружить корреляцию с Н-2 только при таких дозах, при которых лишь одна или несколько из детерминант иммуногенны. Невольно напрашивается мысль, почему первая детерминанта, распознаваемая хозяином, в этом случае является детерминантой, находящейся под генетическим контролем, сцепленным с Н-2, ведь мы знаем, что некоторые антигенные детерминанты могут быть сцеплены с Н-2, но другие не сцеплены? Я думаю, что мы почти совершенно незнакомы с химией вирусной оболочки. Пока я могу ответить на вопрос Levine, обратившись к аналогии с вирусом табачной мозаики: когда этот вирус находится в форме вируса, то он имеет снаружи единственную детерминанту. Если же вирус разрушен и вводится белок вируса табачной мозаики, то проявляется до полудюжины разных детерминант. По-видимому, лучше работать с белком. Вирус ЛХ, возможно, имеет только одну или две детерминанты, и в таком случае вскоре удастся найти четкую корреляцию.

Oldstone. У меня нет замечаний. Я согласен с этим предположением Sela.

Grumet. Применялись ли когда-либо убитые препараты вируса в качестве иммуногена как в опытах *in vitro*, например, при тесте трансформации лимфоцитов, так и для индукции антител? Может быть, таким образом можно было бы оценить иммунный ответ на вирусные антигены независимо от вирусной репликации, болезни или возможных участков прикрепления.

Oldstone. При заражении мышей инактивированным или живым вирусом наблюдается преимущественно гуморальный ответ, сопровождающийся связыванием комплемента. Между гуморальным ответом при связывании комплемента у мышей SWR/J и мышей C3H/I существенной разницы нет. В общем мыши SWR/J отвечают несколько сильнее, но не намного. Величины связывания комплемента низки, и этот тест малопригоден. При исследовании этой вирусной инфекции ставились тесты на клеточный иммунитет. Ясно, что у линий C3H и SWR/J сенсibilизированные лимфоциты могут убивать клетки, выделять лимфотоксин и МИФ. Однако очень трудно проанализировать количественно эти явления, и пока мы еще не смогли сопоставить ответы у C3H/I и SWR/J.

McDevitt. Я полагаю, что вопрос Levine был очень уместным. Может быть, если вводится много вируса, то убиваются все мыши C3H и C3H.Q. Таким образом, интересующий нас эффект можно наблюдать лишь при высоких разведениях, т. е. низких дозах вируса.

Oldstone. Да, это так.

Benacerraf. Не следует полагать, что гены I_g, сцепленные с тканевой совместимостью, могут быть выявлены только с помощью синтетических анти-

генов. Эти гены контролируют также ответ на нативные антигены. Rajewsky и соавт. установили, что ответ на лактатдегидрогеназу свиньи у крыс находится под генетическим контролем, в Н-сцепленным с тканевой совместимостью. Есть и многие другие примеры генетического контроля иммунного ответа на нативные антигены.

Levine. Я все же убежден, что в опытах Oldstone расщеплялась только иммунная реактивность, коррелирующая с Н-2 как таковая. Совместно с Julia и Franco Quagliata мы изучали ГЧЗТ у мышей при инъекциях в подушечку лапки и установили, что у некоторых линий, хотя они хорошо отвечают на данный иммуноген, не выявляется реакция ГЧЗТ в этом тесте. Возможно, что у этих мышей образуются сенсibilизированные Т-клетки, а может быть, и нет, но они не дают заметных реакций ГЧЗТ на антиген, введенный в подушечку лапки. Если острая болезнь представляет собой проявления ПЧЗТ, то, может быть, в опытах Oldstone расщепляется фактор, имеющий отношение к ГЧЗТ, а не фактор, связанный с общей иммунологической реактивностью. Другие мыши также чувствительны к острой болезни?

Oldstone. Мы изучали только линии СЗН.О и SWR/J.

Председатель Allison. По-видимому, мы должны перейти ко второй части выступления Oldstone о влиянии вирусной инфекции на проявление аутоиммунитета у новозеландских мышей.

Oldstone. Обращаясь к этой второй модели болезни иммунного ответа, я хочу прежде всего заметить, что использовались новозеландские мыши двух линий и гибриды. Я хочу представить здесь следующую схему (табл. 116).

ТАБЛИЦА 116

Синтез антиядерных антител у мышей-NZ

Линия	Антиядерные антитела	Антитела против эритроцитов	Ответ антител на ДНК и БСА
NZW	Низкие	Отсутствуют или присутствуют в низком титре	Сильный
NZB NZB × NZW)F ₁	Умеренные Выраженные	Выраженные Умеренные	Умеренный Сильный

У этих мышей наблюдается ряд аутоиммунных явлений. Возможно, наиболее важными из них являются эритроцитарные антитела и антитела против ДНК или антиядерные антитела. Синтез антител против эритроцитов вызывает аутоиммунную гемолитическую анемию, а синтез антител против ДНК и ядер ведет к гломерулонефриту иммунных комплексов.

Я буду говорить здесь об ответе антиядерных антител (АЯА), так как знаю, что Wagner подробнее остановится на ответе против эритроцитов. В нашей лаборатории, работая совместно с Tonietti и Dixon, мы заметили, что у белых новозеландских мышей (NZW¹) отмечается слабый синтез антител против ядер (АЯА) и практически отсутствуют признаки антител против эритроцитов. У новозеландских черных мышей (NZB²), по-видимому, несколько больше антиядерных антител и они являются хорошей моделью

¹ New Zealand White.

² New Zealand Black.

аутоиммунной гемолитической анемии ввиду сильного синтеза антител против эритроцитов. У гибридов F_1 NZB \times NZW наблюдается сильный ответ АЯА и умеренный синтез антител против эритроцитов.

Интересно и очень важно, с моей точки зрения, что если измерить у этих мышей иммунный ответ на комплекс ДНК с метилированным БСА (ДНК и БСА) (как делали Lambert и Dixon), то выясняется, что NZW усиленно реагирует на ДНК, NZB реагируют сильно по сравнению с другими линиями, но реагируют слабее, чем NZW, и гибриды NZB \times NZW тоже усиленно реагируют на иммунизацию ДНК.

Этим экспериментальным данным наиболее соответствует гипотеза о том, что основной дефект у новозеландских мышей представляет собой генетическую гиперреактивность на ядерный антиген или антигены ДНК и подобные антигены. Эта генетическая аномалия может быть введена в действие рядом внешних факторов, которые могут включить или выключить этот иммунный ответ. Следовательно, не существует какого-то одного агента или вируса и могут играть роль многие различные агенты.

Я остановлюсь на синтезе против ядер и против ДНК. У мышей этот ответ ведет к образованию иммунных комплексов ядерного антигена с АЯА и ДНК с антителами к ДНК. Эти комплексы задерживаются в клубочках и вызывают нефрит, от которого в конечном счете животные погибают. Несколько лет назад мы начали изучать частоту антиядерных антител при хронических инфекциях ЛХ и полиомных вирусных инфекциях. Напомню вам, что вирус полиомы — ДНК-вирус, а вирус ЛХ — РНК-вирус. В табл. 117

ТАБЛИЦА 117

Совокупные проявления аутоиммунных ответов у самок новозеландских мышей, хронически зараженных вирусом ЛХ или вирусом полиомы

	Антитела к ядерному антигену ^a на		
	3-й месяц	6-й месяц	9-й месяц
NZW			
Неинфицированные	7 ^a	38	52
ЛХ-вирус	64	94	96
вирус полиомы	33	47	77
NZB			
Неинфицированные	8	44	53
ЛХ-вирус	87	86	100
вирус полиомы	48	65	96
(NZB \times NZW) F_1			
Неинфицированные	13	50	93
ЛХ-вирус	63	100	100
вирус полиомы	40	96	96
SWR/J			
Неинфицированные	0	2	2
ЛХ-вирус	0	1	1
вирус полиомы	0	0	3

^a Процент мышей с антителами к ядерным антигенам.

важно отметить, что определение антиядерных антител при заражении новозеландских мышей РНК-или ДНК-вирусом указывает на усиление их образования у обеих линий и их гибридов. Так, в 3-месячном возрасте у белых

новозеландских мышей частота спонтанных антиядерных антител очень низкая. Однако при хронической инфекции вирусом ЛХ или вирусом полиомы у этих мышей значительно увеличивается титр антиядерных антител.

Напротив, при инфекции у линий SWR/J или СЗН, у которых количество спонтанных антиядерных антител незначительно, нет такого усиления выработки АЯА. Кроме того, у линий, у которых спонтанно образуются АЯА, например у мышей АКР (с частотой около 15—20%) или С57ВL при хронической инфекции тем или другим из двух вирусов, образование антиядерных антител не усиливается. опыты показали, что иммунный ответ направлен преимущественно против оноспиральной ДНК, и количество образующихся антител в 3—6 раз больше у новозеландских мышей, зараженных ЛХ, чем у незараженных.

Наконец, можно выключить этот вид спонтанного ответа против ядер, пользуясь другим РНК-вирусом. Хроническая инфекция новозеландских мышей, вызванная вирусом лактатдегидрогеназы (ЛДГ), препятствует дальнейшему спонтанному образованию АЯА, но не снимает ответа АЯА, если он уже есть. Титр анти-ДНК-антител у новозеландских мышей, зараженных вирусом ЛДВ, составляет только около $\frac{1}{3}$ или меньше от титра незараженных новозеландских мышей. В общем, новозеландские мыши, по-видимому, являются генетически сверхответствующими на стимуляцию ДНК. Некоторые вирусы либо включают, либо выключают этот иммунный ответ.

Председатель Allison. Теперь Warner продолжит обсуждение этой темы и расскажет нам подробнее о генетике новозеландских мышей.

Warner. Продолжая обсуждение иммунопатологии мышей NZB, я хотел бы отметить, что, возможно, существует ген иммунного ответа, контролирующий образование аутоантител против эритроцитов. Частота образования противозэритроцитарных антител у инбредных мышей NZB равна фактически 100% в возрасте 10 мес, но у мышей-гибридов NZB с другой линией обычно значительно меньше в возрасте 9—10 мес. Правда, в возрасте около 1 $\frac{1}{2}$ —2 лет у многих гибридов появляются антитела против эритроцитов. Теперь я хочу обратиться к третьему виду новозеландских мышей, а именно новозеландским шоколадным мышам NZC. Частота гемолитической анемии, согласно положительным пробам Кумбса, у мышей (NZB \times NZC)F₁ в возрасте около 9—10 мес приближается к 100%. Инбредные мыши NZC не дают положительной пробы Кумбса, и эти антитела у мышей NZC не появляются в каком-либо периоде жизни. В возрасте 9—10 мес у других гибридов NZB частота положительной пробы Кумбса не превышает примерно 8%.

Oldstone высказал мнение, что аутоиммунные ответы находятся под генетическим контролем. Я хотел бы продолжить эту мысль. По нашему мнению, существуют минимум два гена у инбредных новозеландских мышей, ответственных за образование антиэритроцитарных антител. Данные о частоте положительных тестов Кумбса у мышей в возрасте 11 мес (табл. 118) указывают на такое же полное проявление антител у (NZB \times NZC)F₁, но пониженную частоту у потомства возвратного скрещивания и F₂. Если рассмотреть эти данные с точки зрения генетического контроля, то они соответствуют предположению о наличии двух генов у NZB, связанных с развитием антиэритроцитарных антител, один из которых является рецессивным и также имеется у мышей NZC.

Таким образом, нас интересует уровень, на котором действуют эти гены. Согласно нашей гипотезе доминантный ген каким-то образом действует на уровне определения: будет или нет запущен иммунный ответ (тогда как у других линий мышей обычно индуцируется толерантность). Мы предпола-

ТАБЛИЦА 118

Положительные реакции Кумбса у гибридных мышей

Комбинация линий	Кумбсположительные ^а				Предположительно Кумбсположительные ^б	
	№	%	1 или 2 доминантных	1 или 2 рецессивных	2 рецессивных (1 у NZC)	1 доминантный, 1 рецессивный (рецессивный у NZC)
NZB	68/74	92	100	100	100	100
NZC	0/38	0	0	0	0	0
(NZB×NZC) F ₁	54/60	90	100	0	0	100
(NZB×NZC)F ₁ ×NZC	15/45	33	50	0	0	50
Другие гибриды NZB (BALB/c×NZB)F ₁	2/27	8	100	0	0	0
(BALB/c×NZB)F ₁ ×(NZB×NZC)F ₁	61/140	43	75	25	25	50

^а В возрасте 11 мес.^б На основании присутствия генотипа NZB.

гаем также, что рецессивный ген действует как ген иммунного ответа. Следовательно, мы предположили, что, если мышь NZC несет этот ген, то, очевидно, можно выявить его проявление у имбредных животных. Была предпринята попытка иммунизации адьювантом Фрейнда, содержащим сингенные или аллогенные эритроциты. Действительно, у многих мышей была вызвана положительная реакция Кумбса (табл. 119).

ТАБЛИЦА 119

Индукция положительных реакций Кумбса иммунизацией эритроцитами

Мыши-реципиенты ^а	Иммунизирующие эритроциты в полном адьюванте Фрейнда		
	физиологический раствор	NZC	BALB/c
NZC	0/16	0/14	10/12
BALB/c	0/15	9/14	0/16

^а Иммунизированные в 3¹/₂ и 6 мес. Тестированы в 6¹/₂ мес.^б Число положительных реакций Кумбса по отношению ко всем реакциям.

Она вызывалась только при использовании аллогенных эритроцитов. Однако, к нашему удивлению, у нашей контрольной линии, в данном случае BALB/c, проба Кумбса также стала положительной, но опять же только при иммунизации аллогенными эритроцитами.

Затем мы продолжили исследования на нескольких других линиях мышей с помощью эритроцитов NZC и нашли признаки генетического контроля в этой системе (табл. 120).

Чувствительность линий к индуцированной аутоиммунной гемолитической анемии

Линия	Процент положительных реакций Кумбса ^а	Линия	Процент положительных реакций Кумбса ^а
NZC	0	A/J	0
BALB/c	43	129/J	0
C57BL	0	(C57 × A/J)F ₁	0
CBA	0	(CBA × DBA/2)F ₁	0
(CBA × C57)F ₁	0	DBA/2	0

^а Эритроциты NZC в полном адьюванте Фрейнда на 0 и 24-й день. Реакция Кумбса на 38-й день.

Поэтому мы предполагаем, что мыши NZC и BALB/c несут ген, который может действовать по типу иммунного ответа, специфического для образования аутоантител против эритроцитов. По нашему мнению, эти опыты означают также, что для включения гена надо пользоваться аллогенными эритроцитами, которые, возможно, действуют наподобие гаптена с носителем, т. е. аллогенная детерминанта служит носителем для аутоэритроцитарной детерминанты. В этих случаях мыши BALB/c действительно образуют сывороточные антитела, направленные против аллогенных эритроцитов NZC, и, наоборот, мыши NZC вырабатывают агглютинины против эритроцитов BALB/c.

Другой тип генетического контроля чувствительности к опухолям наблюдался у мышей NZB и BALB/c. Я имею в виду индукцию плазмоцитом. Табл. 121 показывает, что после обработки минеральным маслом у мышей BALB/c и NZB часто наблюдались плазмоцитомы. Наши цифры занижены, так как многие из мышей нашей колонии BALB/c погибали от вирусной

ТАБЛИЦА 121

Генетический контроль чувствительности к развитию плазмоцитомы у мышей

Линия ^а	Число мышей	Процент развития опухоли ^б	
		плазмоцитомы	другие опухоли
BALB/c, NZB	107	36	3
(BALB/c × NZB)F ₁	96	60	20
Другие гибриды	241	0,5	14
BALB/c	200	3	15
Гибриды NZB	105	6	28
Контрольные NZB гибриды (без минерального масла)	108	0	6

^а Все мыши обработаны минеральным маслом.

^б Процент животных с опухолями от первоначального количества мышей.

пневмонии, а мыши NZB умирают от гломерулонефрита. Частота плазмоцитом значительно больше у гибридов и у инбредных NZB. В эти же сроки плазмоцитом была очень низкой. Возможно, в этом также состоит проявление одного из генов аутоиммунного ответа.

В общем мы склонны предположить на основании исследования трех новозеландских линий NZB, NZW и NZC, что у них имеются три гена, контролирующие аутоиммунитет. Один ген контролирует индукцию аутоиммунного ответа. Возможно, что на него влияют внешние факторы, как и в опытах Oldstone, и этот ген имеется только у мышей NZB. По-видимому, существуют также гены типа генов иммунного ответа, один из которых контролирует образование аутоантител против эритроцитов, и, очевидно, имеется у мышей NZB и NZC, но отсутствует у NZW. Другой ген контролирует ответы против ДНК и имеется у NZB и NZW, но отсутствует у NZC. У гибридов (NZB × NZC)F₁ не наблюдается большой частоты гломерулонефрита.

Serpellini. Последнее замечание Wagner мне не совсем ясно. Может ли он сказать нам, находятся ли эти гены по крайней мере в одном локусе или в разных локусах.

Wagner. Это весьма интересный вопрос. Недавно Rose исследовал образование антител против тиреоглобулина и частоту тиреоидита у мышей. Он установил наличие генетического контроля и сцепленность с H-2. Эффект выражается в степени тяжести болезни, определяемой по лимфоцитарной инфильтрации щитовидной железы, а также в образовании антител. В частности, мыши BALB/c не отвечают на экстракт щитовидной железы, тогда как в данной ситуации мыши BALB/c синтезируют антитела против эритроцитов. Теперь мы хотели бы установить в опытах с гибридами и потомками от возвратного скрещивания, подобны ли эти два контроля аутоиммунных ответов по аллелям.

Braun. Насколько мне известно, вирус ЛДВ является иммуноусиливающим агентом у других линий мышей. Oldstone сказал нам, что ЛДВ у мышей NZB ослабляет ответ антител против ядер. Возможно, вновь возникла ситуация, в которой избыточная стимуляция циклического АМФ в иммунокомпетентных клетках препятствует образованию антител. В таком случае влияние ЛДВ на образование антител у мышей NZB нельзя расценивать непременно как исключение из общего правила повышенной отвечаемости у мышей NZB.

Oldstone. Следует помнить о нескольких обстоятельствах. Прежде всего новозеландские мыши не обладают усиленной отвечаемостью на все антигены. Данные Serottini и других ясно доказали, что при введении некоторых антигенов, например гемоцианина, новозеландские мыши имеют относительно слабую отвечаемость. Таким образом, дело зависит также от использованного антигена. По-видимому, в отношении новозеландских мышей интересующим нас антигеном является ДНК. Затем мы должны помнить, что заражение ЛДВ вызывает иммунное усиление, насколько мне известно, только после иммунизации с помощью 4ГТ. Впервые это явление описал Notkins, и мы подтвердили его наблюдения. Однако заражение ЛДВ не усиливает иммунного ответа на бараньи эритроциты и гемоцианин, по крайней мере у линии SWR/J, C3H/J, B10.D2/o¹ и B10.D2/n¹.

Braun. У мышей CFW и C57BL мы наблюдали усиленный ответ на бараньи эритроциты в присутствии ЛДВ.

¹ B10. D2/o и B10. D2/n = B10. D2/old и B10. D2/new — старая и новая линии.

Oldstone. Таким образом, мы должны согласиться с тем, что важны антиген и линия мышей наряду с дозой и способом введения. Я считаю, что одним из интересных аспектов инфекции ЛДВ у новозеландских мышей является повышение активности ферментов. В связи с этим возникает, в частности, вопрос: повышает ли этот вирус активность ДНК-азы? По-видимому, этим можно объяснить некоторые другие отмеченные нами эффекты, но пока мы не знаем ответа на этот вопрос.

Sela. Надо упомянуть еще одну аутоиммунную болезнь, находящуюся под генетическим контролем, — экспериментальный аллергический энцефаломиелит. Stone и соавт. в Национальном институте здравоохранения обнаружили значительное различие по чувствительности к этой болезни среди линий морских свинок («Proc. Soc. Exp. Biol. Med.», 1969, v. 132, p. 341). Мы также изучали недавно эту чувствительность и установили, что в одинаковых экспериментальных условиях клинические симптомы появляются у 63% морских свинок линии 13 (у 15 из 24 животных, тогда как из 11 морских свинок линии 2 не заболела ни одна (Webb, Teitelbaum, Agnon, Sela — неопубликованные данные). Таким образом, возможно, что чувствительность к экспериментальному аллергическому энцефаломиелиту сцеплена с главной системой тканевой совместимости у морских свинок.

Green. Пока на этой конференции мы рассматривали главным образом гены иммунного ответа, сцепленные с гистосовместимостью и имеющие отношение к синтетическим антигенам или чужеродным белкам. Я хочу сделать здесь одно замечание, связанное со словами Sela: в опытах на морских свинках с введением лимитирующих доз ДНФ₆ МСА мы сделали наблюдение, убедительно показывающее, что иммунный ответ на нативные собственные белки, возможно, также находится под генетическим контролем. Протоколы исследований, проведенных вместе с Paul и Venesegraf, ясно говорят об этом явлении. Действительно, эти данные уже были изложены на первой сессии Venesegraf (см. рис. 2). Мы установили, что морские свинки линий 2 и 13 одинаково отвечают на 100 мкг ДНФ₆ МСА. Однако, когда доза ограничивалась (1 мкг), линия 13 давала значительно более сильный ответ. Мы хотели установить, зависит ли это от гаптена или от носителя.

В табл. 122 показаны некоторые использованные нами приемы.

Прежде всего мы применяли один и тот же гаптен на разных носителях, например, лимитирующие дозы на глюкозооксидазе или ДНФ-БСА. Живот-

ТАБЛИЦА 122

Сравнение иммунных ответов морских свинок линий 2 и 13 на лимитирующие дозы различных гаптено-белковых конъюгатов

Гаптено-белковый конъюгат	Иммунные ответы
ДНФ ₆ МСА	13 > 2 ^a
ДНФ ₃₃ МСА	13 > 2
Пипсил-МСА	13 > 2
ДНФ ₆ -МСА ^b	13 > 2
ДНФ ₆ -глюкозооксидаза	13 = 2
ДНФ ₆ БСА	2 > 13

^a Связан с локусом 13 (показано при анализе возвратного скрещивания).

^b В этом конъюгате диитрофенильная группа связана с карбоксильными группами альбумина морской свинки.

ные линии 2 отвечали сильнее, чем линии 13. Таким образом, более сильный ответ на ДНФ-МСА у животных линии 13, по-видимому, не связан с гаптекрестные реакции (пипсил) с МСА, то получатся тот же результат (линия 13 отвечает сильнее, чем линия 2). Этот же эффект был обнаружен, когда мы получали комплексы ДНФ с карбоксильными группами, а не с аминокруппами лизина (более сильный ответ у линии 13, чем у линии 2).

Надо сделать два вывода: 1) до настоящего времени большинство из нас считали, что МСА является иммуногеном для морских свинок, иммунизированных конъюгатами гаптена с МСА, потому что МСА изменяется гаптен ДНФ или любым гаптен и, следовательно, МСА становится чужеродным для морских свинок, однако 2) мы убедились, что независимо от того, как мы изменяем МСА (а, очевидно, каждый гаптен изменяет МСА по своему), получают ясные указания на генетический контроль (линия 13 давала более сильный ответ, чем линия 2). Таким образом, возможно, что существует ген Ig для немодифицированного МСА, который можно обнаружить, только если толерантность к МСА нарушается путем изменения МСА гаптен. В табл. 123 показана общая возможная картина. У животных линии 13 существует ген Ig к МСА. Однако функция Т-клеток и В-клеток отсутствует ввиду толерантности к МСА. Когда ДНФ-МСА используется в лимитирующих дозах для иммунизации морских свинок линии 13, то можно получить ответ, так как МСА изменяется и свинки линии 13 имеют ген Ig КМСА. У животных линии 2 иммунизация ДНФ-МСА в лимитирующих дозах не вызывает ответа, так как у животных этой линии отсутствует ген Ig к МСА.

ТАБЛИЦА 123

Теоретическая схема функциональных компонентов, необходимых для инбредных морских свинок, чтобы выявить полный иммунный ответ к избирательным антигенам

Линия	Антиген ^a	ГенIg	Т-клетка	В-клетка	Ответ АТ
13	МСА	+	—	—	—
	ДНФ-МСА	+	+	+	+
	БСА	—	+	+	—
2	ДНФ-ПЛЛ	—	—	+	—
	МСА	—	—	—	—
	ДНФ-МСА	—	+	+	—
	БСА	+	+	+	+
	ДНФ-ПЛЛ	+	+	+	+

+ Признаки присутствуют.
— Признаки отсутствуют.

Следовательно, я предлагаю гипотезу о том, что к собственным белкам возможно имеются гены иммунного ответа, которые удастся обнаружить только подобным приемом.

Wagner. Может ли Green доказать нам, что это иммунный ответ на нативный МСА, а не на МСА, модифицированный гаптеном? Возможно, что это другая детерминанта к аутологичному МСА.

Green. Мои доказательства не прямые, так как пока еще никто не изучал при помощи прямых физико-химических методов изменения, происходящие

Oldstone. Таким образом, мы должны согласиться с тем, что важны антиген и линия мышей наряду с дозой и способом введения. Я считаю, что одним из интересных аспектов инфекции ЛДВ у новозеландских мышей является повышение активности ферментов. В связи с этим возникает, в частности, вопрос: повышает ли этот вирус активность ДНК-азы? По-видимому, этим можно объяснить некоторые другие отмеченные нами эффекты, но пока мы не знаем ответа на этот вопрос.

Sela. Надо упомянуть еще одну аутоиммунную болезнь, находящуюся под генетическим контролем, — экспериментальный аллергический энцефаломиелит. Stone и соавт. в Национальном институте здравоохранения обнаружили значительное различие по чувствительности к этой болезни среди линий морских свинок («Proc. Soc. Exp. Biol. Med.», 1969, v. 132, p. 341). Мы также изучали недавно эту чувствительность и установили, что в одинаковых экспериментальных условиях клинические симптомы появляются у 63% морских свинок линии 13 (у 15 из 24 животных, тогда как из 11 морских свинок линии 2 не заболела ни одна (Webb, Teitelbaum, Agnon, Sela — неопубликованные данные). Таким образом, возможно, что чувствительность к экспериментальному аллергическому энцефаломиелиту сцеплена с главной системой тканевой совместимости у морских свинок.

Green. Пока на этой конференции мы рассматривали главным образом гены иммунного ответа, сцепленные с гистосовместимостью и имеющие отношение к синтетическим антигенам или чужеродным белкам. Я хочу сделать здесь одно замечание, связанное со словами Sela: в опытах на морских свинках с введением лимитирующих доз ДНФ₆ МСА мы сделали наблюдение, убедительно показывающее, что иммунный ответ на нативные собственные белки, возможно, также находится под генетическим контролем. Протоколы исследований, проведенных вместе с Paul и Venasaga, ясно говорят об этом явлении. Действительно, эти данные уже были изложены на первой сессии Venasaga (см. рис. 2). Мы установили, что морские свинки линий 2 и 13 одинаково отвечают на 100 мкг ДНФ₆ МСА. Однако, когда доза ограничивалась (1 мкг), линия 13 давала значительно более сильный ответ. Мы хотели установить, зависит ли это от гаптена или от носителя.

В табл. 122 показаны некоторые использованные нами приемы.

Прежде всего мы применяли один и тот же гаптен на разных носителях, например, лимитирующие дозы на глюкооксидазе или ДНФ-БСА. Живот-

ТАБЛИЦА 122

Сравнение иммунных ответов морских свинок линий 2 и 13 на лимитирующие дозы различных гаптено-белковых конъюгатов

Гаптено-белковый конъюгат	Иммунные ответы
ДНФ ₆ МСА	13 > 2 ^a
ДНФ ₃₃ МСА	13 > 2
Пипсил-МСА	13 > 2
ДНФ ₆ -МСА ^b	13 > 2
ДНФ ₆ -глюкооксидаза	13 = 2
ДНФ ₆ БСА	2 > 13

^a Связан с локусом 13 (показано при анализе возвратного скрещивания).

^b В этом конъюгате диитрофенильная группа связана с карбоксильными группами альбумина морской свинки.

ные линии 2 отвечали сильнее, чем линии 13. Таким образом, более сильный ответ на ДНФ-МСА у животных линии 13, по-видимому, не связан с гаптекрестные реакции (пипсил) с МСА, то получатся тот же результат (линия 13 отвечает сильнее, чем линия 2). Этот же эффект был обнаружен, когда мы получали комплексы ДНФ с карбоксильными группами, а не с аминокруппами лизина (более сильный ответ у линии 13, чем у линии 2).

Надо сделать два вывода: 1) до настоящего времени большинство из нас считали, что МСА является иммуногеном для морских свинок, иммунизированных конъюгатами гаптена с МСА, потому что МСА изменяется гаптенном ДНФ или любым гаптенном и, следовательно, МСА становится чужеродным для морских свинок, однако 2) мы убедились, что независимо от того, как мы изменяем МСА (а, очевидно, каждый гаптен изменяет МСА по своему), получают ясные указания на генетический контроль (линия 13 давала более сильный ответ, чем линия 2). Таким образом, возможно, что существует ген Ig для немодифицированного МСА, который можно обнаружить, только если толерантность к МСА нарушается путем изменения МСА гаптенном. В табл. 123 показана общая возможная картина. У животных линии 13 существует ген Ig к МСА. Однако функция Т-клеток и В-клеток отсутствует ввиду толерантности к МСА. Когда ДНФ-МСА используется в лимитирующих дозах для иммунизации морских свинок линии 13, то можно получить ответ, так как МСА изменяется и свинки линии 13 имеют ген Ig КМСА. У животных линии 2 иммунизация ДНФ-МСА в лимитирующих дозах не вызывает ответа, так как у животных этой линии отсутствует ген Ig к МСА.

ТАБЛИЦА 123

Теоретическая схема функциональных компонентов, необходимых для инбредных морских свинок, чтобы выявить полный иммунный ответ к избирательным антигенам

Линия	Антиген ^o	ГенIg	Т-клетка	В-клетка	Ответ АТ
13	МСА	+	—	—	—
	ДНФ-МСА	+	+	+	+
	БСА	—	+	+	—
2	ДНФ-ПЛЛ	—	—	+	—
	МСА	—	—	—	—
	ДНФ-МСА	—	+	+	—
	БСА	+	+	+	+
	ДНФ-ПЛЛ	+	+	+	+

+ Признаки присутствуют.
— Признаки отсутствуют.

Следовательно, я предлагаю гипотезу о том, что к собственным белкам возможно имеются гены иммунного ответа, которые удастся обнаружить только подобным приемом.

Wagner. Может ли Green доказать нам, что это иммунный ответ на нативный МСА, а не на МСА, модифицированный гаптенном? Возможно, что это другая детерминанта к аутологичному МСА.

Green. Мои доказательства не прямые, так как пока еще никто не изучал при помощи прямых физико-химических методов изменения, происходящие

в МСА под действием гаптена. Так, например, клеточный иммунитет к МСА высокоспецифичен, т. е. не существует перекрестной реактивности в реакции ГЧЗТ между пипсил-МСА и ДНФ-МСА. Следовательно, мы полагаем, что МСА изменяется по-разному (по крайней мере, с точки зрения иммунологического аппарата морских свинок). Тем не менее иммунологическая ответимость (наличие гена Ig) к лимитирующим дозам пипсил-МСА и ДНФ-МСА, видимо, сцеплена с наличием антигенов гистосовместимости линии 13. Таким образом, возможно, что ген Ig распознает не изменение МСА, индуцированное гаптенем, а скорее немодифицированный МСА.

Gerrellini. Мой вопрос обращен к участникам совещания которые являются специалистами по иммунопатологии мышей NZB. Я хотел бы знать, можно ли обнаружить у этих животных аутоантитела против лимфоцитов? Дело в том, что при болезни человека системной красной волчанкой, которая во многих отношениях сходна с болезнью NZB, часто содержатся гуморальные антитела, очевидно, вырабатываемые В-клетками. Эти антитела абсорбируются на лимфоцитах и блокируют *in vitro* реактивность Т-клеток в СКЛ при стимуляции ФГА. Таким образом, согласно гипотезе Burnet, вирусное заболевание может изменить нормальную взаимную регуляцию В- и Т-клеток, индуцируя В-клетки к выработке антител, действующих на функцию Т-клеток.

Председатель Allison. Mellors и Liff с соавт. описали также антитела против лимфоцитов у мышей NZB. Было бы интересно продолжить эту дискуссию, но должен выступить Biozzi о реакциях на инфекцию у двух линий мышей, которые он писал на 3-й сессии.

Biozzi. Я хочу дополнить свои прежние замечания некоторыми данными характеризующими резистентность к экспериментальным опухолям и инфекциям у сильно и слабо отвечающих линий мышей. Эти две линии мышей были выращены путем избирательного скрещивания по признаку образования агглютининов к бараньим эритроцитам. Выяснилось, что эти же линии отличаются и по гуморальному ответу на все другие испытанные до настоящего времени антигены, не вступающие в перекрестную реакцию.

В табл. 124 показаны линии со слабым и сильным ответом на пневмо-

ТАБЛИЦА 124

Отвечаемость «сильных» и «слабых» линий на оптимальную дозу вводимого внутривенно пневмококкового полисахарида III

Линия	Количество БОК ^a на селезенку		
	неиммунизированные мыши	пик ответа на 4-й день	отношение сильные/слабые
«Слабая»	5 000	63 000	24
«Сильная»	12 000	1 500 000	

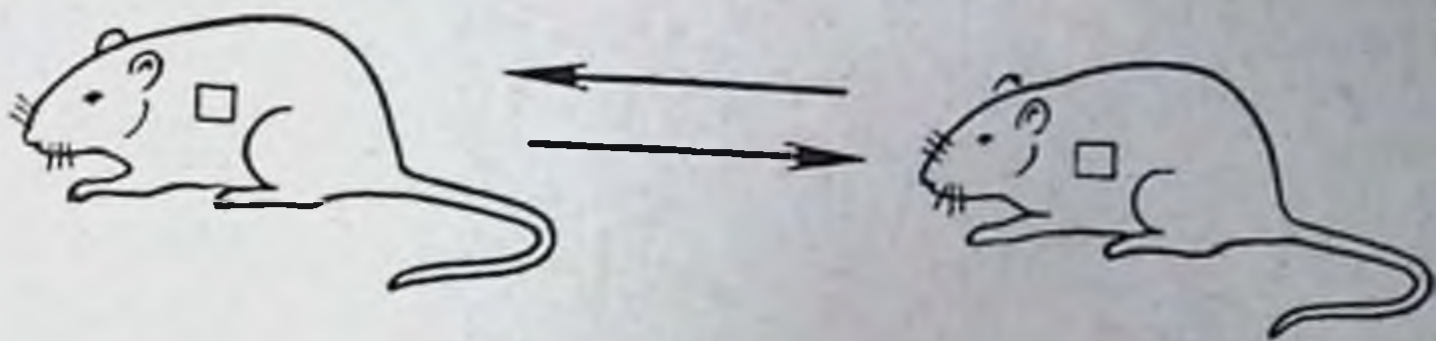
^a S III чувствительные эритроциты барана.
«Eur. J. Immunol.», 1972.

кокковый полисахарид типа III. Отвечаемость исследовалась по бляшкообразующим клеткам после введения бараньих эритроцитов, покрытых SIII. Фоновое количество БОК у неиммунизированных мышей примерно одинаково у обеих линий. Однако после иммунизации количество БОК зна-

Обмен трансплантатами кожи между линиями

Реципиент из сильно
отвечающей линии

Реципиент из слабо
отвечающей линии



Время отторжения трансплантата

12,6 дня

10,4 дня

Титр цитотоксических антител после отторжения

1/200

1/3

Цитотоксический тест ставится с клетками лимфатических узлов
донора трансплантата кожи

Рис. 73. Отторжение трансплантата кожи при межлинейной пересадке и продукция цитотоксических антител, у сильно- и слабоотвечающих реципиентов.

чительно больше у животных с сильным ответом. У мышей реакция на этот антиген совершенно не зависит от тимуса. Следовательно, первый вывод, который можно было сделать из опыта, состоит в том, что две линии безусловно расходятся на уровне потенциальной функции В-лимфоцитов. Расходятся ли они также на уровне потенциальной функции Т-лимфоцитов? Очень простой опыт, изображенный на рис. 73, показывает, что такого расхождения нет.

При обмене кожными трансплантатами между мышами с сильным и слабым ответом отторжение происходит примерно в одинаковые сроки. Однако титр цитотоксических антител против антигенов тканевой совместимости значительно выше у сильно отвечающих, чем у слабо отвечающих животных. Следовательно, эти две линии различаются по образованию антител в ответ на антигены тканевой совместимости, но не по клеточному ответу на те же антигены. Предполагается, что основным механизмом отторжения кожных трансплантатов является клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами. Это относится также к другим моделям, в которых играет роль клеточный иммунный ответ Т-лимфоцитов, например контактная сенсибилизация, ответ на ФГА и реактивность в РТПХ.

Таким образом, при селекции мышей мы получили четкую диссоциацию между способностью к синтезу гуморальных антител, весьма различной у двух линий, и клеточным иммунитетом, одинаковым у двух линий. Это важно, так как при введении указанным двум линиям мышей микроорганизмов или опухолевых клеток вторгшиеся клетки встречают разные гуморальные ответы, но один и тот же клеточный ответ. Следовательно, эти животные могут служить для изучения относительной роли гуморальной и клеточной защиты против инвазии бактериями или опухолевыми клетками.

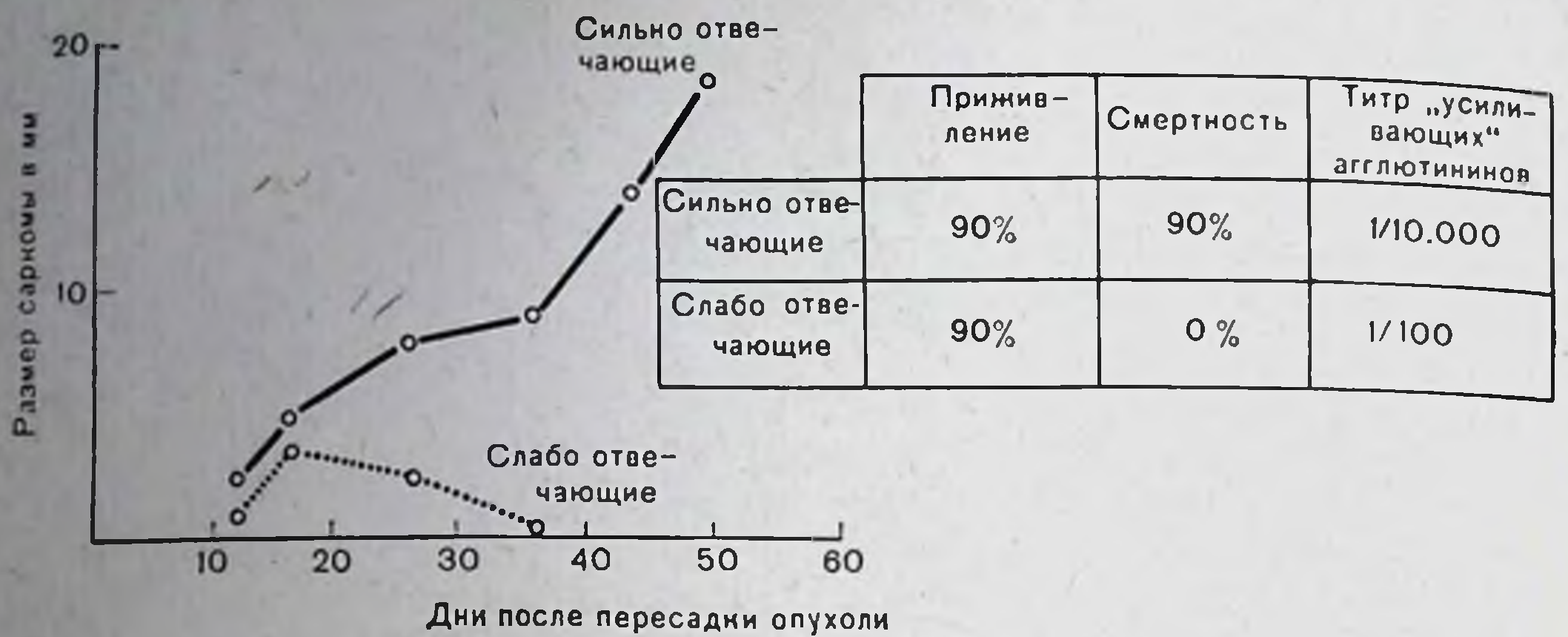


Рис. 74. Развитие аллогенной саркомы 180, пересаженной подкожно сильно и слабо отвечающим мышам.

Как показано на рис. 74, саркома 180, переданная путем подкожной имплантации у мышей с сильным ответом, растет быстро и вызывает смертность в 90—100%. С другой стороны, у слабо отвечающих животных после некоторого периода первоначального роста все опухоли регрессируют и исчезают. Известно, что саркома 180 особенно чувствительна к усиливающему эффекту антител. Регрессия опухоли у слабо отвечающих животных, вероятно, объясняется отсутствием синтеза антител. Следовательно, клеточная защита может полностью сыграть свою роль. Асцитная опухоль Эрлиха — это другая аллогенная опухоль, резистентная к усиливающему эффекту антител. Данные, приведенные в табл. 125, показывают, что между двумя

ТАБЛИЦА 125

Отсутствие связи между иммунным ответом и резистентностью к асцитной опухоли Эрлиха

Хозяин	Число мышей	Смертность ^a , %	Среднее время до гибели, дни
«Сильная» линия 1/10 000 агглютининов против ЭБ	25	100	10
«Слабая» линия 1/100 агглютининов против ЭБ	25	100	13

^a 10⁶ клоток опухоли внутрибрюшинно.

линиями мышей нет разницы по резистентности к этой опухоли. Наблюдается лишь небольшое увеличение продолжительности жизни среди слабо реагирующих животных. Мы изучали лейкозы у мышей AKR и DBA/2, однако наши линии с сильным и слабым ответом не заражаются этими лейкозами при передаче клетками. Клеточная передача лейкоза возможна толь-

ко у сингенных линий. Мы отметили также, что признак «синтез антител» у линий с сильным и слабым ответом в большой мере наследуется гибридами F_1 каждой линии с другими линиями мышей, как показано в табл. 126. Лейкоз DBA/2 передается внутривенным путем (10^3 клеток) и внутрибрюшинным (10^4 клеток) мышам (DBA/2 \times сильно отвечающие) F_1 и (DBA/2 \times слабо отвечающие) F_1 . У обеих гибридных линий наблюдается 100% смертность без существенной разницы по средней продолжительности жизни (около 10 дней). Аналогичные результаты наблюдаются у гибридов (AKR \times сильно отвечающие) F_1 и (AKR \times слабо отвечающие) F_1 при внутрибрюшинном введении 100 лейкемических селезеночных клеток AKR (табл. 127). Таким образом можно сделать вывод, что, несмотря на различный гуморальный иммунный ответ (см. табл. 126), чувствительность этих гибридов к сингенному лейкозу не меняется.

ТАБЛИЦА 126

Пик ответа агглютининов против ЭБ, достигаемый у различных линий мышей

Линия	Титр
«Сильная» линия F_{20}	1/10 000
«Слабая» линия F_{20}	1/100
AKR	1/300
DBA/2	1/1280
(AKR \times сильную)	1/2000
(AKR \times слабую)	1/100
(DBA/2 \times сильную)	1/3840
(DBA/2 \times слабую)	1/480

Иммунизация эритроцитами барана, 5×10^8 внутривенно.

В предыдущих опытах мы обнаружили сильную защиту против сингенно переданного лейкоза AKR в результате предварительной обработки *Corynebacterium parvum*.

В табл. 127 показано, что такая защита вызывается также у гибридов сильно и слабо отвечающих животных. Повышенная резистентность, вы-

ТАБЛИЦА 127

Эффект *Corynebacterium parvum* на чувствительность сильно и слабо отвечающих гибридов AKR к лейкемии линии AKR

Гибриды	AKR-лейкемия (100 лейкемических клеток селезенки внутрибрюшинно)		
	обработка	смертность, %	среднее время выживания, дни
Сильная \times AKR	Отсутствует	100	29
	+	31	—
Слабая \times AKR	—	100	27
	+	16	—

+ Имеется.
— Отсутствует.

званная обработкой *S. parvum*, таким образом, не связана с уровнем гуморального ответа. Защитный эффект *S. parvum* сильнее у гибридов со слабой отвечаемостью, чем у гибридов с сильным ответом. Возможно, это объясняется тем, что сильный адьювантный эффект *S. parvum* увеличивает синтез антител.

У линий сильно и слабо отвечающих животных, как показано в табл. 128, определялась резистентность к естественному патогенному мик-

ТАБЛИЦА 128

Эффект вакцинации «сильной» и «слабой» линий на их резистентность к заражению *Salmonella typhimurium*

Иммунизация	Заражение (кол-во микробных тел)	«Сильная» линия		«Слабая» линия		
		смертность, %	среднее время выживания, дни	смертность, %	среднее время выживания, дни	
Контроли	5000 <i>S. typhimurium</i> внутрикожно	100	10,4	45	—	
	1000 <i>S. typhimurium</i> внутрибрюшинно	100	5,4	100	8,7	
Вакцинированные	живые не- вирулентные <i>S. typhimurium</i>	1000 <i>S. typhimurium</i> внутрибрюшинно	100	8,6	10	—
	фракции, экстрагированные из <i>S. typhimurium</i>	1000 <i>S. typhimurium</i> внутрибрюшинно	100	8	10	—

роорганизму мышей *Salmonella typhimurium*. Слабо отвечающие животные значительно более резистентны к этой инфекции, чем сильно отвечающие. При крайне вирулентной инфекции, вызываемой внутрибрюшинным введением, эта разница между линиями выражается лишь в средней продолжительности жизни. Внутрикожное введение вызывает менее острую инфекцию, которая все же убивает 100% сильно отвечающих животных и только 50% слабо отвечающих. Специфическая вакцинация авирулентным *S. typhimurium* или иммуногенным экстрактом почти не дает эффекта у сильно отвечающих мышей, удлиняя лишь продолжительность жизни, тогда как из слабо отвечающих мышей у 90% отмечается явная защита. Эта большая резистентность слабо отвечающих животных представляет собой общее явление, так как была установлена при всех исследованных до настоящего времени инфекциях. Инокуляция вирулентных *Yersinia pestis* вызывает 100% смертность обеих линий, но продолжительность жизни слабо отвечающих животных в среднем значительно больше. Специфическая вакцинация иммуногенной фракцией *Y. pestis* полностью защищает слабо отвечающих животных, но не дает эффекта у сильно отвечающих (табл. 129).

Эти данные указывают на большую чувствительность к инфекциям мышей с сильной отвечаемостью. Очевидно, это означает, что резистентность

ТАБЛИЦА 129
Эффект вакцинации «сильной» и «слабой» линий на их резистентность к заражению *Yersinia pestis*^a

Обработка	«Сильная» линия		«Слабая» линия	
	смертность, %	среднее время выживания, дни	смертность, %	среднее время выживания, дни
Контроль	100	4,5	100	7,7
Вакцинированные ^б	100	5	0	

^a 1000 микроорганизмов, введенных подкожно.

^б 500 мкг экстракта из *Y. pestis* внутрикожно.

к инфекции детерминируется той же группой генов, которые регулируют гуморальную иммуноотвечаемость. Разница между линиями по резистентности к инфекции может быть объяснена периферическим эффектом антител. По-видимому, эти антитела защищают вторгшихся микроорганизмов против разрушительной атаки клеточного иммунитета, который, как интересно отметить, обладает одинаковой потенцией у обеих линий.

Braun. Я хотел бы остановиться на данных, приведенных Biozzi в отношении опухолей и ясно доказывающих, что генетические различия по фракции В-клеток влияют на опухолевый рост в сингенных системах.

Как я уже говорил, мы можем создать фенотипический эквивалент генетически контролируемой активной функции В-клеток при помощи стимуляторов эндогенного циклического АМФ. Выяснилось, что такие стимуляторы, например поли-А:У или теофиллин, обладают также выраженным противоопухолевым эффектом и задерживают рост различных линий опухолевых клеток, индуцированных химически или вирусом у сингенных хозяев. Мы установили, что такой противоопухолевый эффект агентов, которые, как известно, усиливают активность В-клеток, столь же легко вызывается у облученных животных, как и у необлученных.

Даже предварительная обработка сингенных опухолей перед имплантацией стимуляторами эндогенного циклического АМФ замедляет развитие опухолей. Иными словами, я хочу сказать, что при обсуждении любой работы, в которой используются опухолевые клетки, мы должны помнить, что наряду с обычными иммунными ответами, сдерживающими опухолевый рост, существует прямая чувствительность опухолевых клеток к агентам, повышающим эндогенный уровень циклического АМФ. Так, например, резкий эффект БЦЖ и *Corynebacteria*, возможно, объясняется не только влиянием на популяции Т- или В-клеток, но и механизмом, который прямо замедляет опухолевый рост.

Herzenberg. Biozzi доказывал, что, по-видимому, существует до 10 генов, отличающих линии с сильным и слабым ответом на бараньи эритроциты. Возможно, что для других ответов, которые изучает Biozzi, существует 10, 20 или даже 50 генов. Кроме того, очевидно, что при разных ответах, преобладающую роль играют разные гены или разные комбинации генов. Поэтому я хотел бы посоветовать Biozzi, поскольку он работает с видом животных, поддающихся генетическому анализу, заняться идентификацией генов. Это можно было бы сделать, получив конгенные линии и проследив за тем или другим или за несколькими эффектами, которые он изучает у разных линий. Тогда биохимику или иммунологу было бы легче установить, какие параметры важны при различных эффектах, описанных Biozzi в его выступлениях.

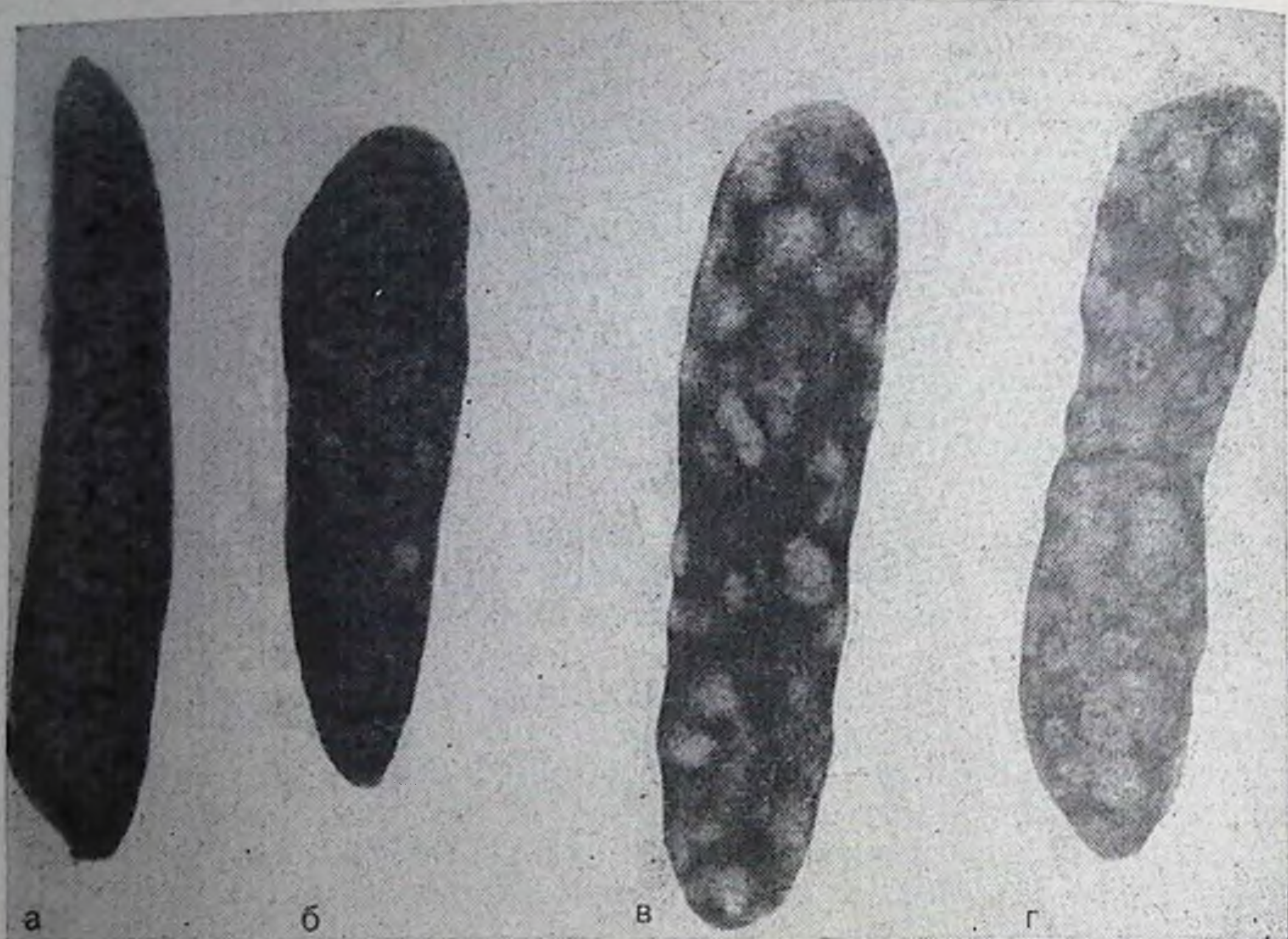


Рис. 75. Селезенки мышей (СЗН/Не × С57ВL/На) F_1 , облученных дозой 900Р и получавших инъекцию физиологического раствора (радиационный контроль) (а); 10^6 клеток костного мозга мышей С57ВL/На (б); 10^6 клеток костного мозга мышей СЗН/Не (в); или 10^6 сингенных клеток (г). Мышам вводили ^{125}I -ДУР, через 5 дней после введения костного мозга и селезенки удаляли и фиксировали в жидкости Бойнса в течение 17 ч. Образующиеся крупные узелки представляют собой очаги гемопоэза. Обнаруживается сходство между селезенками а и б (0,01—0,05% включения ^{125}I -ДУР) и между селезенками в и г (0,3—1,0% включения ^{125}I -ДУР) («J. Exp. Med.», 1971, v. 134, p. 1513).

Biozzi. Я согласен, что было бы весьма интересно выделить эти линии. Безусловно, это будет не легко, но это необходимо для того, чтобы наиболее глубоко изучить генетический контроль в такой системе.

Председатель Allison. В заключение обсуждения моделей на этой сессии выступит **Cudkowicz** по вопросу о резистентности гибридов.

Cudkowicz. Я хочу рассказать о модели генетического контроля реактивности на аллотрансплантаты, которая весьма своеобразна, поскольку связана с недостаточностью кроветворных клеток у массивно облученных мышей. Предполагается, что такие животные ареактивны после облучения, но, по видимому, они могут реагировать на аллогенные и ксеногенные кроветворные клетки. Вторая особенность этой модели заключается в том, что трансплантаты, перенесенные от родителей гибридам F_1 , не приживаются, а также не удается перенос аллогенных клеток. (Гибридные мыши рассматриваются как всегда воспринимающие родительские ткани, согласно классической теории.) Третья особенность модели заключается в тканевой специфичности, т. е. несовместимости, ограниченной кроветворными клетками.

Пролиферация пересаженных костномозговых клеток качественно оценивается путем осмотра селезенки реципиентов, фиксированных в фиксаторе Буэна (рис. 75), а количественно — путем мечения ДНК клеток, всту-

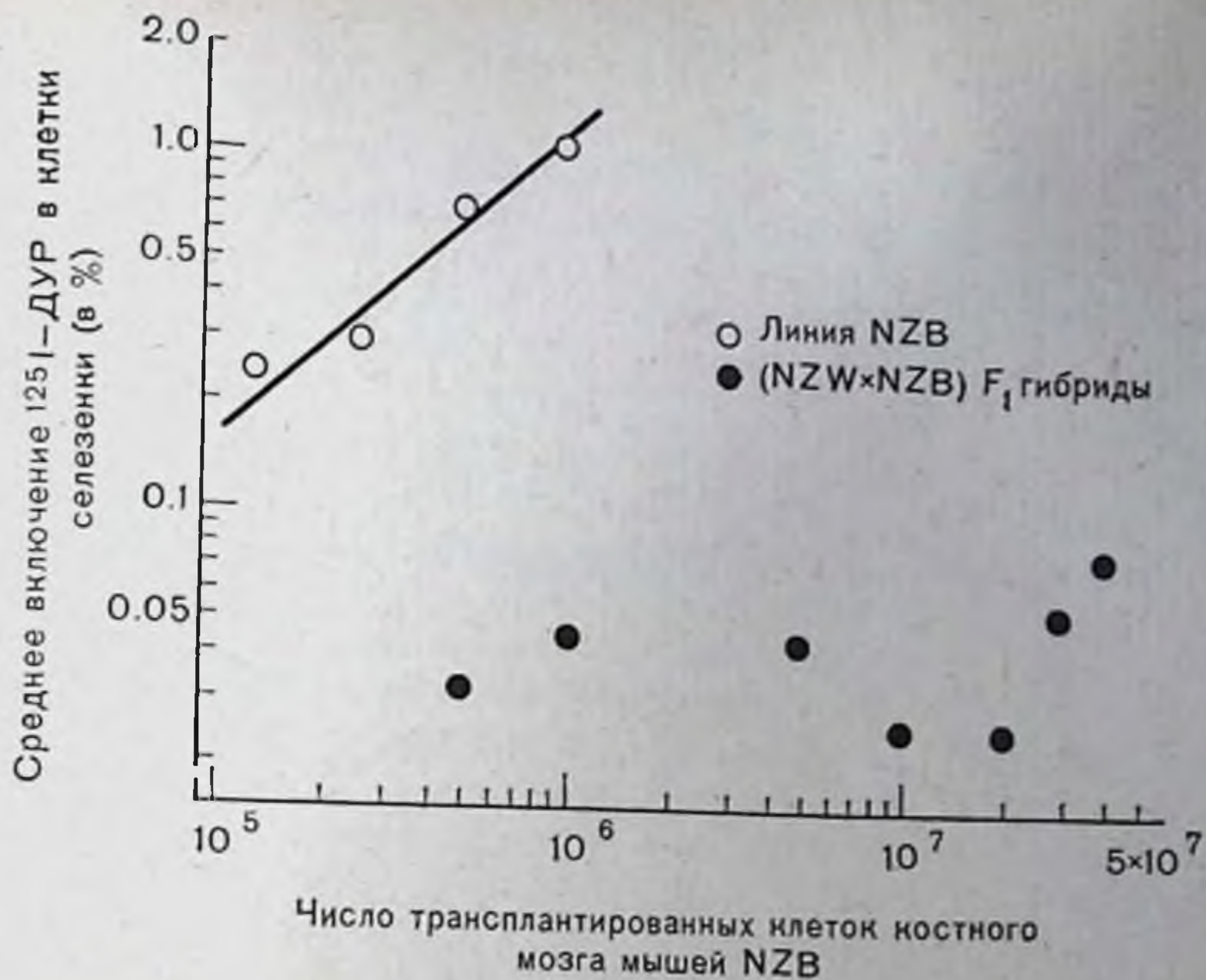


Рис. 76. Среднее включение ^{125}I -ДУР при различном количестве трансплантированных за 5 дней до эксперимента клеток костного мозга сильно облученным NZB (NZW × NZB)F₁ мышам (900—100 Р излучения ^{137}Cs) (5—10 животных обоего пола — кружочки).

пающих в митоз, предшественником ДНК 5-йодо-2'-диоксиуридином- ^{125}I (I-ДУР) (рис. 76). Через 5 дней после перевивки 10^6 ядерных клеток у мышей, восприимчивых к трансплантату костного мозга, селезенка покрыта узелками и поглощение ^{125}I -ДУР составляет от 0,3 до 1%. Однако этого явления нет у резистентных мышей и у облученных контролей. Один из наиболее ярких примеров, резистентности к перевивке костного мозга показан на рис. 76. Поглощение селезенкой ^{125}I -ДУР увеличивается у сингенных хозяев в линейной зависимости от количества перевитых клеток NZB от $1,25$ до 10×10^5 клеток на мышь. Однако количество клеток, в 30—300 раз большее, не может эффективно восстановить популяцию (через 5 дней после перевивки) в селезенке облученных мышей (NZW × NZB)F₁ (доза облучения 900—1000 рад гамма-лучей ^{137}Cs).

При изучении некоторого количества гибридных линий F₁ становится ясно, что генетические детерминанты резистентности полиморфны. Гибриды некоторых сочетаний линий восприимчивы к клеткам данного родителя, а другие гибриды невосприимчивы (табл. 130). Аналогичные результаты можно получить при использовании ряда других линий. Я привожу NZB только как типичный пример. Если учитывать H-2 у доноров и реципиентов, то можно сделать следующие обобщения: 1) гибриды, гомозиготные по H-2, восприимчивы к переносу костного мозга родителей;

2) гетерозиготы либо резистентны, либо восприимчивы к переносу родительских клеток;

3) замена одной линии родителей гибрида F₁ конгенной линией, отличающейся по комплексу H-2, часто придает восприимчивость резистентному гибриду или наоборот (например, резистентные гибриды B10 × NZB) и восприимчивые гибриды B10.A × NZB (см. табл. 130).

4) мыши F₁ одного и того же гетерозиготного генотипа H-2 могут принадлежать либо к восприимчивой, либо к резистентной группе, как, например,

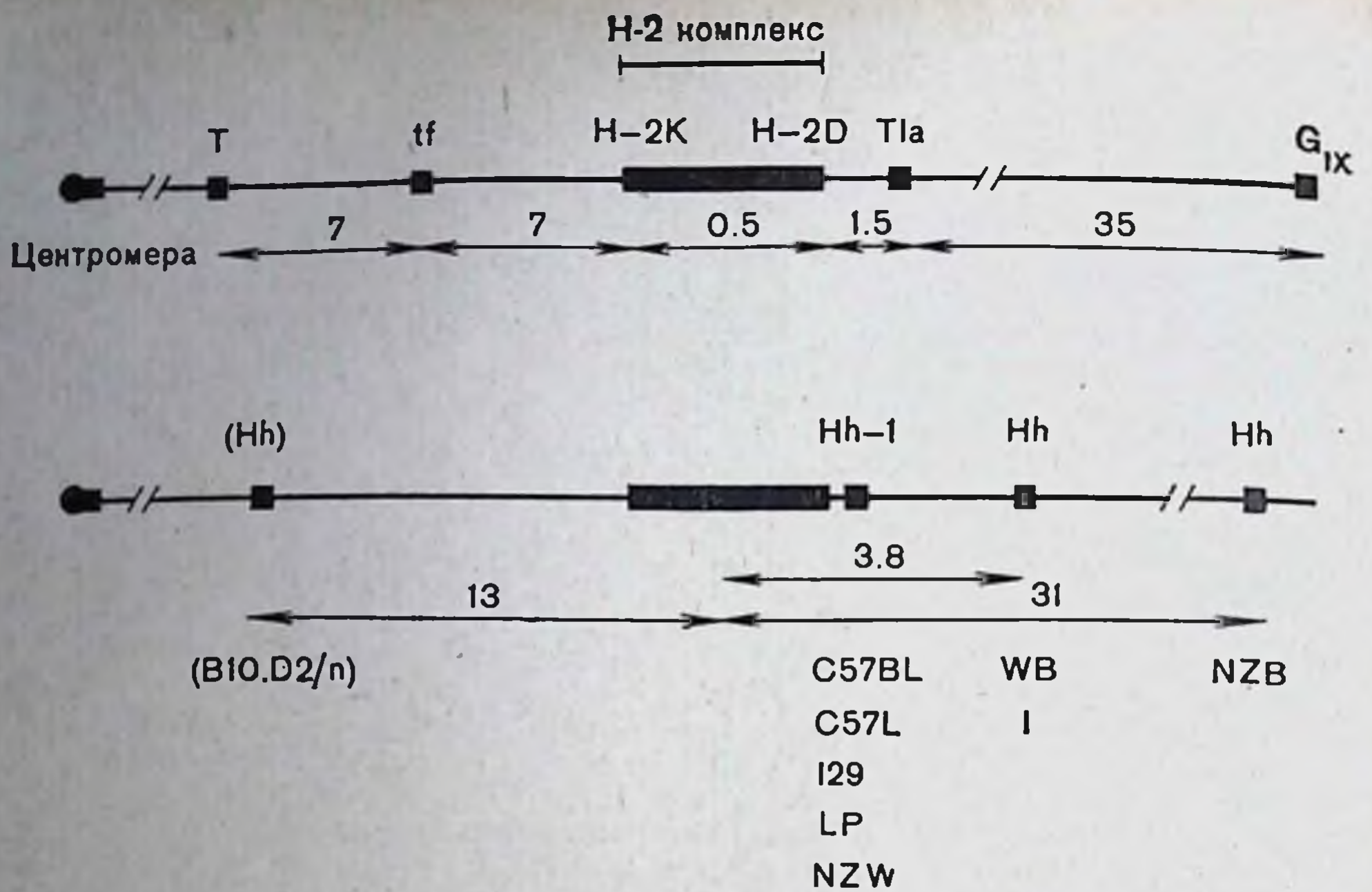


Рис. 77. Упрощенная карта комплекса H-2 в девятой группе сцепления. Верхняя карта показывает частоты кроссинговера генов-маркеров, а нижняя карта — Hh-генов у ряда линий инбредных мышей. Hh-детерминанта линии B10.D2/n — в скобках, так как неизвестно, на какой стороне H-2 он находится.

гибриды $H-2^a/H-2^d(DBA/1 \times NZB)F_1$ (восприимчивые) и B10.tf, $T \times NZB$ (резистентные), показанные в табл. 130.

Подобные данные, проверенные в ряде других линий, помимо NZB, заставляют сделать вывод, что первичные генетические детерминанты резистентности гибридов связаны с комплексом H-2 (см. выше обобщения 1, 2, 3). Однако предполагается также, что дополнительные генетические факторы, не сцепленные с H-2, могут регулировать проявление резистентности (4-е обобщение), возможно подобно Ig-генам, контролирующим проявления

ТАБЛИЦА 130]

Классификация гибридов F_1 по чувствительности и устойчивости к пересадке 10 клеток костного мозга родителей мышей NZB. Мыши классифицировались с помощью методики включения ^{125}I -диоксиуридина через 5 дней после облучения и трансплантации

Чувствительные гибриды F_1	H-2	Линия донора NZB (\leftrightarrow)(H-2 ^d)	
		резистентные гибриды F_1	H-2
A × NZB	a/d	B10 × NZB	b/d
B10.A × NZB	a/d	NZB × B10.A(2R)	d/h
DBA/2 × NZB	d/d	B10.A(5R) × NZB	i/d
BALB/c × NZB	d/d	B10.Br × NZB	k/d
B10.D2/n × NZB	d/d	C3H/He × NZB	k/d
HTG × NZB	g/d	B10.tf: T × NZB	q/d
WB × NZB	j/d	NZW × NZW	z/d
DBA/1 × NZB	q/d		
A.SW × NZB	s/d		
SJL × NZB	s/d		

гуморального и клеточного иммунитета. Эти выводы подтверждаются экспериментами с возвратным скрещиванием и скрещиванием между линиями и анализом рекомбинантных по H-2 линий. Следовательно, карта H-2 должна включить еще несколько генов, обозначаемых буквами Hh, т. е. гибридная или гемопоэтическая гистосовместимость (рис. 77).

Hh-1 тесно сцеплен с H-2D, но его можно отделить от T1a и H-2K путем кроссинговера. Линии C57BL, C57L, 129 и LP имеют общий аллель этого локуса. Линия NZW имеет другой аллель Hh-1. В ряде других линий детерминанты Hh находятся на расстоянии 3, 8, 13 или 31 единицы кроссинговера от H-2. Из 4 генов 3 гена Hh группы сцепления IX находятся справа от H-2. Точная локализация 4-го гена Hh еще не установлена.

Продукты генов Hh проявляются в гомозиготных клетках имбредных мышей, но отсутствуют в клетках гетерозигот. Пока продукты генов Hh распознаются при помощи описанной трансплантационной биопробы, но не определяются серологическими реагентами. Гены Hh, возможно, являются рецессивными детерминантами структур клеточной поверхности, которые распознаются как чужеродные какой-то радиорезистентной «лимфомиелоидной» клеткой гибрида F₁ или аллогенной мышью-хозяина. С другой стороны, можно допустить, что проявление некоторых аллелей Hh может подавляться у гетерозигот. Так или иначе, резистентность к трансплантатам костного мозга должна рассматриваться как реакция реципиента против трансплантата, обладающая специфичностью. Действительно, резистентность гибридов можно снять, если обработать будущих реципиентов иммунодепрессантами и другими биологически активными агентами (табл. 131).

ТАБЛИЦА 131

Виды обработки хозяина, в результате которых отменяется резистентность к родительским костномозговым трансплантатам

	Отмена резистентности гибрида
Неспецифическая	Циклофосфамид Дробная доза облучения Corynebacterium parvum Лошадиная антисыворотка против мышинных тимоцитов
Специфическая	Множественное введение селезеночных клеток родителей

Детальные данные могут быть получены из работ: Cudkowitz, Bennett. — «J. Exp. Med.», 1971, v. 134, p. 1513; Gregory e. a. — «Transplantation», 1972, v. 13, p. 138.

Более прямое отношение к этому доводу имеет тот факт, что после повторных инъекций взрослым мышам F₁ несовместимых родительских клеток наступает иммуноспецифическое снятие резистентности. Принципы этой обработки подобны обработке, индуцирующей ареактивность В-клеток (детали см. в работе Cudkowitz, Bennett. — «J. Exp. Med.», 1971, v. 134, p. 1513). Следовательно, приобретенная восприимчивость к трансплантату родительского костного мозга является специфической в иммунологическом смысле слова.

Для решения вопроса о том, регулируют ли гибридную резистентность гены, подобные генам Ig можно вывести несколько гибридов F₁ идентичного типа Hh-1 от разных родительских линий, избранных среди конгенных линий мышей, и определить резистентность к родительским трансплан-

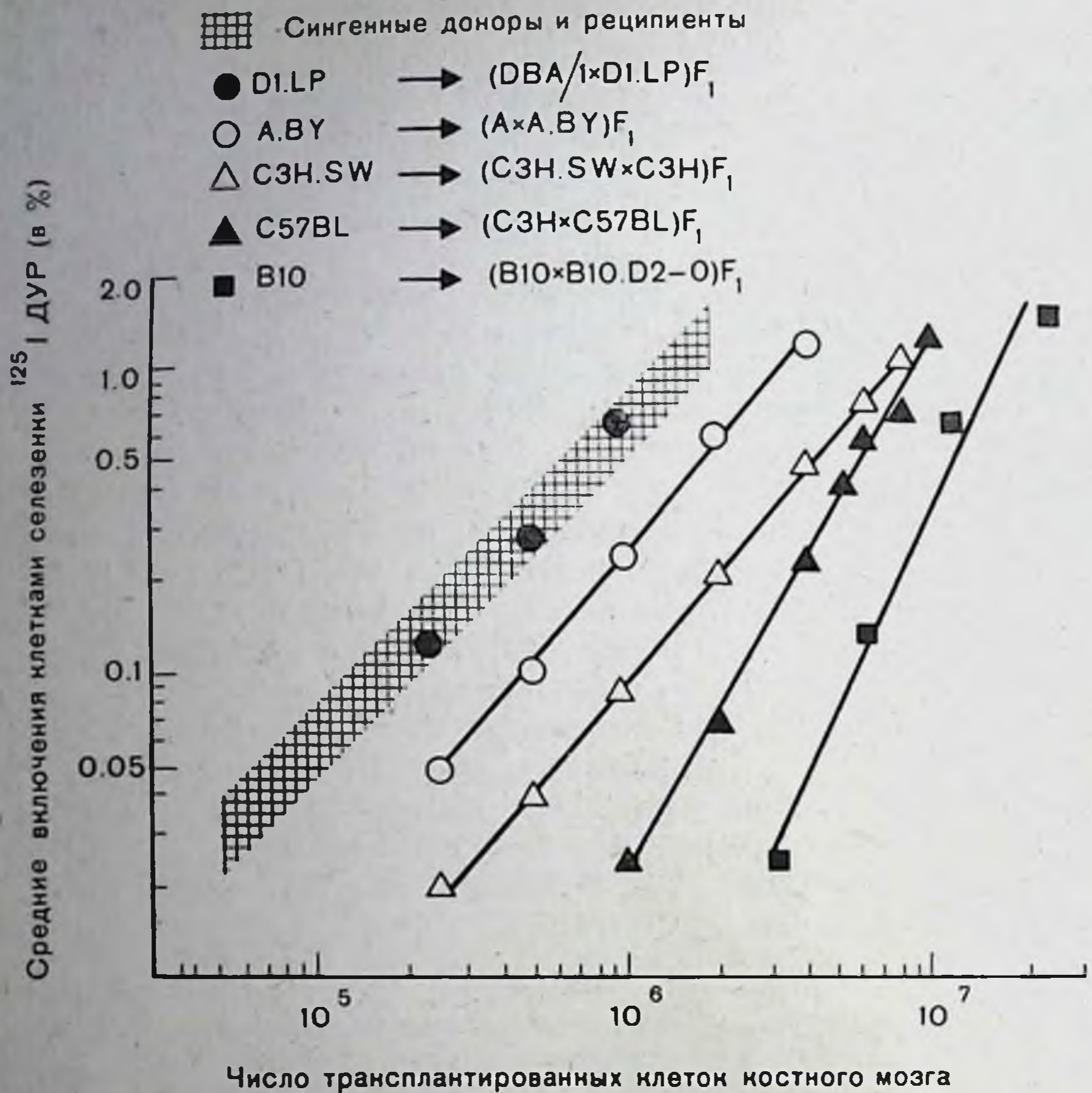


Рис. 78. Включения ^{125}I -ДУР клетками селезенки через 5 дней после пересадки определенного количества клеток костного мозга родителей облученным мышам (900 Р). Все доноры несут тот же Нh-1 аллель. Родители всех гибридов, за исключением C3H × C57B — пары конгенных мышей. Устойчивость отсутствует у сингенных и DBA/1 × D1.LP реципиентов. Резистентность различной степени наблюдается у других гибридов в обратной связи с генетикой родителей.

татам. Иными словами, получаемые таким образом мыши F_1 генетически резистентны и гетерозиготны по комплексу Н-2, Нh-1, но имеют геном данной имбредной, т. е. гомозиготной, линии. На рис. 78 показаны результаты опытов с 4 типами таких гибридов: каждый из них, очевидно, обладал геномом линий DBA/1, А, C3H и B10 соответственно, за исключением хромосомного сегмента группы сцепления IX, включающего Нh-1. Пятый гибрид C3H×C57BL, который не отвечает этим требованиям, также показан на рисунке. Все гибриды получают родительские клетки, гомозиготные по аллелю Нh-1^a; следовательно, в этом эксперименте изучается не эффект Нh-1, а влияние других генов на резистентность гибридов. Ясно, что степень резистентности, определяемая по смещению вправо кривых доза—эффект, весьма различна у гибридов разных конгенных линий; порядок ее снижения таков: B10, C3H, А и DBA/1. У гибридов DBA/1×D1.LP резистентность не выявляется, несмотря на гетерозиготность по Нh-1, хотя гибриды B10.D2×D1.LP и др. весьма резистентны к клеткам D1.LP. Эти данные показывают, что степень резистентности к родительским транспланта-там регулируют другие генетические факторы, а не Нh-1.

- (DBA/1×129)_F₁ Мыши (H-2^a/H-2^b)
- (DBA/1×D1.LP)_F₁ Мыши (H-2^a/H-2^b)
- ◇ [(DBA/1×129)_F₁ × D1.LP]BC₁ и [(D1.LP×DBA/1×129)_F₁]BC₁ Мыши (H-2^a/H-2^b)
- ◇ " " " " " " (H-2^a/H-2^b)

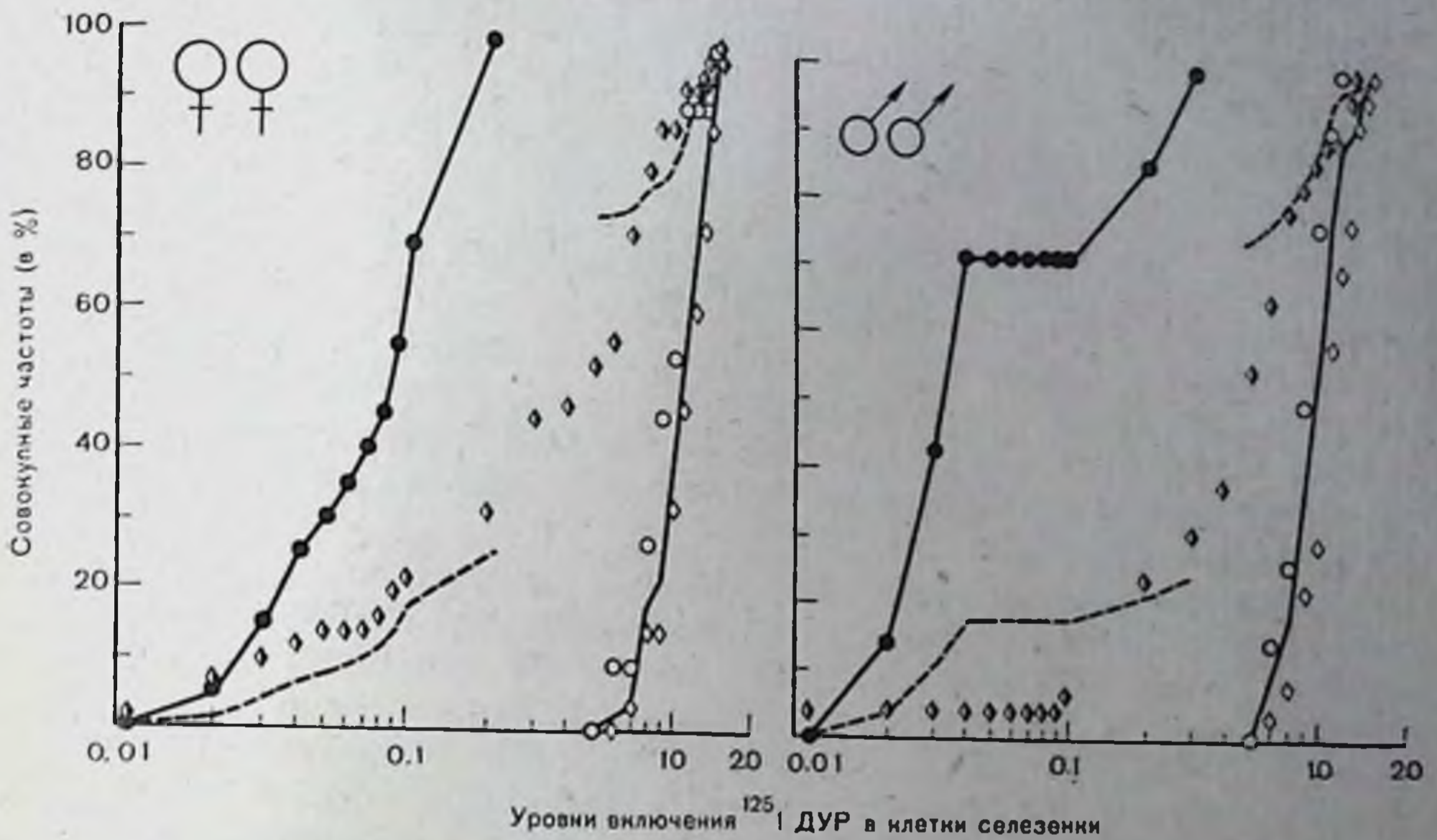


Рис. 79. Совокупные частоты уровней включения ¹²⁵I-ДУР в клетки селезенки реципиентов 5×10^5 клеток костного мозга мышей. Линии и тип H-2 мышей F₁ и BC₁ указаны на верхней части рисунка. Сплошные линии показывают наблюдающуюся частоту, а пунктирные — ожидаемую частоту для популяций BC₁, учитывая предполагаемое соотношение фенотипов F₁, как это описано в тексте.

Второй метод заключается в межгибридном скрещивании и возвратном скрещивании, чтобы определить количество генов, участвующих в регуляции, и выяснить, являются ли такие регуляторные гены доминантными. Для подобного опыта пригодна пара мышей (DBA/1×129)_F₁ и (DBA/1×D1.LP)_F₁, так как оба типа гибридов имеют общие аллели H-2 (H-2^a/H-2^b) и Hh-1, хотя первый гибрид резистентен, а второй восприимчив к клеткам D1.LP (рис. 79). Гибриды (DBA/1×129)_F₁ скрещиваются с мышами D1.LP; DBA/1 и D1.LP являются конгенно резистентными линиями и, кроме того, D1.LP и 129 имеют H-2^b. Из потомства возвратного скрещивания 90 мышей являются гомозиготными H-2^b/H-2^b и 80 — гетерозиготами H-2^a/H-2^b. Только среди последних могут быть мыши, резистентные к костному мозгу D1.LP, так как гетерозиготность по тесно сцепленному локусу Hh-1 является абсолютным требованием для резистентности гибридов. Гибриды F₁ и мыши H-2^a/H-2^b, выведенные при обратном скрещивании, получают. Им вводят 5×10^5 костномозговых клеток D1.LP и спустя 5 дней определяют резистентность или восприимчивость. На рис. 79 показана кумулятивная частота распределения фенотипов (поглощение ¹²⁵I-ДУР). Распределение фенотипов среди резистентных и восприимчивых гибридов F₁ рассматривается как исходное распределение для того, чтобы можно было сравнить модельные графики с результатами расщеплений, полученных при обратном скрещивании.

Результаты совершенно ясны: 80 мышей H-2^a/H-2^bBC₁ расщепляются на классы резистентных, частично восприимчивых и восприимчивых мышей.

Отношение между тремя классами сегрегантов очень близко к модельному отношению 1:2:1, которое, очевидно, должно существовать согласно допущению, что два самостоятельных гена с суммирующимся эффектом регулируют резистентность гибрида и что доминантные аллели придают резистентность. Однако можно предложить и другое объяснение этим данным, а именно, переменную пенетрантность одного гена вместо влияния двух генов. Единственным способом для того, чтобы выбрать одно из этих двух предположений, было бы тестирование расщепляющегося потомства. Не обнаружено связи резистентности или восприимчивости с маркерными генами H-2 в группе сцепления IX, A^w (Агути с белым брюшком), в группе сцепления V, B (коричневый), в группе сцепления VIII и d (ослабленный коричневый), в группе сцепления II. Основным выводом состоит в том, что резистентность гибридов к трансплантатам родителей, как и резистентность к аллогенным трансплантатам (Cudkowicz. — «J. Exp. Med.», 1971, v. 134, p. 284), регулируется ограниченным числом генетических факторов, иных, чем детерминанты Hh, возможно, таким же образом как и регуляция других сложных защитных реакций.

Невольно возникает предположение, что реактивность облученных мышей к кроветворным аллотрансплантатам является рудиментом первичной иммунной системы, которая в процессе эволюции предшествовала развитию адаптационной системы у млекопитающих, имеющей тимусное происхождение. Филогенетическое развитие лимфоидной системы параллельно развитию чувствительности к облучению и некоторым токсическим химическим веществам. Более примитивные позвоночные животные малочувствительны к тому и другому, другие животные нечувствительны к облучению, но чувствительны к химическим веществам (Finstad, Fange, Good. — In. «Lymphatic Tissue and Germinal Centers in Immune Response». Plenum Press, New York, 1969, p. 21). Возможно, что механизм отторжения костномозговых трансплантатов после облучения всего тела мышей является этапом эволюции, предшествующим адаптационной, более эффективной лимфоидной иммунной системе, характеризующим чувствительность к таким препаратам, как циклофосфамид, и нечувствительностью к острому облучению.

Председатель Allison. На этой сессии мы назвали несколько примеров наследственных различий по восприимчивости к инфекциям, включая вирусные, которые контролируются менделирующими генами. Эти гены обладают мощным влиянием на восприимчивость или резистентность хозяев и не зависят от основных локусов гистосовместимости. Кроме того, наблюдается ассоциация между генами по основным антигенам гистосовместимости и восприимчивостью к некоторым болезням, например мышинному лейкозу и лимфоцитарному хориоменингиту. Однако эти ассоциации менее сильны, чем связи, о которых я говорил, и механизмы, лежащие в их основе все еще не ясны. Систематические исследования с помощью иммунодепрессантов и избирательного восстановления иммунных функций должны показать, в какой мере наследственные различия восприимчивости осуществляются в результате функционирования иммунокомпетентных клеток. Прежде чем сделать окончательные выводы об основных механизмах, потребуется еще много работы, однако уже полученные результаты говорят о возможностях генетического анализа факторов, связанных с восприимчивостью и резистентностью против болезней.

Сессия 6

СВЯЗИ МЕЖДУ ТИПОМ HL-A И БОЛЕЗНЯМИ

Аналогия между системами HL-A и H-2. Связь между генами HL-A и MLC или предполагаемыми человеческими Ig генами. Проблемы генетического анализа восприимчивости к болезням у человека. Обоснование связи между HL-A и специфическими болезнями. Использование принципов популяционной генетики для анализа корреляции между HL-A и болезнями. Осложнения возникающие из-за технических трудностей серотипирования по HL-A. Оценка данных, указывающих на связь HL-A с лимфогранулематозом и аутоиммунными болезнями. Исследования HL-A и лимфогранулематоза в семьях. Связь между фенотипом HL-A и образованием антител против HL-A.

Председатель Serpellini. Организаторы конференции просили меня на этой сессии по возможности избегать сложных таблиц с многочисленными цифрами, касающихся системы HL-A¹, и длинными списками, видимо, связанных с ней заболеваний. Конечно, мы постараемся выполнить это пожелание, но некоторых сводок данных нельзя избежать, если мы хотим найти общий язык между иммунологами, изучающими человека и различных животных.

В табл. 132 я привел результаты 5-го Workshop² по гистосовместимости в обновленном виде. Эта конференция состоялась в июне 1972 г. Я перечислил специфичности HL-A, распознаваемые при помощи серологических методов (в основном лимфоцитотоксическим при воздействии гуморальных антител и комплемента), т. е. антигены SD по терминологии Bach. Они подразделяются на две «сегрегантные» серии — LA (1-я) и FOUR (2-я). Это разделение основано на том, что представители одной «серии» всегда находятся на разных хромосомах, а обозначения приняты по историческим причинам. Следовательно, у гетерозиготных родителей члены одной серии всегда расходятся при мейозе в разные гаметы. Иными словами, представители одной серии являются аллелями одного и того же локуса, и среди популяции частота их должна соответствовать закону Харди—Вайнберга. Наоборот, специфичности, принадлежащие к разным сериям, передаются от данного родителя или вместе, или по принципу «отталкивания» (но не независимо), так как они контролируются либо одной и той же хромосомой, либо двумя гомологичными хромосомами. Иными словами, две серии контролируются двумя тесно сцепленными локусами, которые вместе представляют сложную систему. Концепция двух локусов была подтверждена кроссинговером с частотой 0,8% между LA и FOUR (например, sibс 6 в семье, упомянутой в табл. 133).

¹ Современную номенклатуру системы HL-A см.: Histocompatibility testing. Munksgaard, Copenhagen, 1975.

² Workshop — принятое теперь в русских текстах обозначение регулярных международных конференций по иммуногенетике человека.

ТАБЛИЦА 132

Раздельные факторы в двух локусах системы HL-A¹

1-й локус, или LA			2-й локус, или FOUR		
частота			частота		
факторы (антигены)	фенотип	генотип	факторы (антигены)	фенотип	генотип
HL-A1	0,243	0,125	{HL-A13 ^a	0,077	0,039
{HL-A3	0,298	0,149	{HL-A12 ^a	0,135	0,076
{HL-A11	0,096	0,048	{W18 ^b	0,212	0,116
HL-A10 ^b	0,192	0,101	{HL-A5 ^a	0,214	0,116
W29	0,067	0,034	{W5 ^b	0,365	0,204
{W30	0,106	0,053	W15 ^a	0,135	0,059
{W31	0,029	0,014	W17 ^a	0,058	0,020
{W32	0,163	0,082	W21 ^a	0,087	0,044
{W19,6	0,120	0,034	{HL-A7 ^b	0,097	0,047
{HL-A2	0,388	0,126	{W-10 ^b	0,106	0,025
{W-28	0,029	0,014	{W-27 ^a	0,048	0,024
HL-A9	0,240	0,130	W-22 ^b	0,058	0,029
Неустановленные (бланк)			{HL-A8 ^b	0,135	0,069
			{W-14 ^b	0,087	0,048
			W-16 ^b	0,144	0,074
			Неустановленные (бланк)	0,001	0,010

¹ Histocompatibility Testing. J. Dausset, ed. Munksgaard. Copenhagen, 1972.
 Частота официально принятых факторов HL-A (терминологический доклад ВОЗ, Histocompatibility Testing, 1970) в европейских популяциях. W-факторы признаны Workshops 1970 и 1972 гг.
 В скобках — группы перекрестно-реагирующих антигенов, имеющих общую суперттипическую специфичность.

^a Факторы, имеющие суперттипическую специфичность 4a.

^b Факторы, имеющие суперттипическую специфичность 4b.

^b Разделен на W25 и W26.

ТАБЛИЦА 133

Расщепление в семье по комплексу HL-A^a

Типирующая сыворотка	ABO		Серия A				Серия FOUR				MLC	Хромосома	
	A	B	1	2	3	9	5	7	8	12		отец	мать
Отец	+	+	+	+	—	—	+	—	+	—	XY	a	b
Мать	—	—	—	—	+	+	—	+	—	+	WZ	c	d
Ребенок: 1	+	—	+	—	+	—	—	+	+	—	XW	a	c
2	+	—	+	—	—	+	—	—	+	+	XZ	a	d
3	+	—	—	+	+	—	+	+	—	—	YW	b	c
4	—	+	—	+	—	+	+	—	—	+	YZ	b	d
5	—	+	+	—	+	—	—	+	+	—	XW	a	c
6	—	+	+	—	+	—	+	+	—	—	YW	a/b	c
7	+	—	+	+	+	—	—	+	+	—	YW	a/b	c

^a В этой гипотетической семье родители гетерозиготными по 3 сцепленным локусам: LA (1-й) и FOUR (2-й) распознаются в результате серотипирования (MLC (3-й) — с помощью активации лимфоцитов.

Гаплотип отца (хромосомы) a:1,8; X; b:2,5Y. Гаплотип матери c:3,7, W; d:9,12, Z.

Ребенок 6 является рекомбинантом между 1-м и 2-м локусом, ребенок 7 — рекомбинант 2-м и 3-м в результате кроссинговера при мейозе у отца.

Активация в СКЛ получена между индивидами, имеющими (предположительно) различные генотипы MLC. Таким образом, у родственников серологический подбор обычно является гарантией совместимости (отсутствие активации в СКЛ). В результате рекомбинации серологическая идентичность между неродственными индивидами не является гарантией идентичности по MLC. В семьях также кроссинговер может давать исключения: сибсы 6 и 7 являются СКЛ-совместимыми с сибсом 3, который имеет серологический фенотип. Сибсы 7 — СКЛ-несовместимый с сибсами 1 и 5, хотя они имеют одинаковый серологический фенотип. Группы крови ABO и HL-A сегрегируют независимо.

Поражает аналогия с двумя локусами D и K в системе H-2, особенно разницу между частной и общей специфичностью. Цифры, указанные в табл. 132, соответствуют частной специфичности, т. е. детерминантам, которые являются единственными в своем роде и (насколько нам известно) характерны для одного аллеля. Скобками объединены основные семейства перекрестно-реагирующих антигенов, т. е. продукты аллелей HL-A, имеющие общие детерминанты. Я предлагаю называть такие детерминанты «супертипическими»¹, так как их распределение среди популяции «включает» более чем одну «субтипическую» специфичность (Cerrellini. — «Prog. in Immunol.», 1971, v. 1, p. 973). Примерами супертипических детерминант являются специфичности 4a и 4b, характеризующие две основные группы перекрестно-реагирующих аллелей 2-й серии. Вероятно, хотя еще не вполне доказано, что каждый аллель HL-A является цистроном, контролирующим синтез полипептида, имеющего свое собственное самостоятельное проявление на клеточной поверхности, согласно мозаичной модели Sengen. Следовательно, на клетках гетерозигот по обоим локусам (как бывает чаще всего) распознаются 4 разные молекулярные популяции. «Субтипические» специфичности, как следует из их определения, являются характерными детерминантами аллельного продукта, тогда как «супертипические» детерминанты соответствуют другим участкам той же молекулы, которые, однако, являются общими более чем для одного аллеля. Вероятно, замещение аминокислоты в результате точковой мутации в состоянии изменить один, а может быть, несколько детерминант, но другие части молекулы не меняются. Следовательно, перекрестная реакция обусловлена эволюционной близостью или родством.

Набор фенотипических признаков, передаваемых вместе одним сложным хромосомным участком, называется гаплотипом. В отношении HL-A гаплотип состоит из двух серологических специфичностей по одной в каждом локусе (если считать, что blanks соответствует нераспознанным аллелям). Поскольку каждый антиген одного локуса в той же хромосоме может быть обнаружен в связи с каждым антигеном другого локуса, согласно данным табл. 132, может образоваться $16 \times 12 = 192$ разных гаплотипов. Это соответствует 19 915 разным генотипам и нескольким тысячам фенотипов.

Средняя вероятность наличия двух неродственных индивидов, имеющих один и тот же серологический фенотип HL-A, составляет менее 0,001. Однако среди детей одной семьи, если не учитывать редкой возможности кроссинговера внутри системы HL-A, можно обнаружить только 4 разных фенотипа (табл. 133, дети 1 и 5 идентичны). Bodmer пояснит тот факт, что нетипичные ассоциации между аллелями двух локусов, например HL-A1 и 8, HL-A3 и 7, встречаются чаще, чем можно было бы ожидать на основании их частоты в отдельности (неравновесное сцепление). Уже говорилось о тесной связи системы HL-A с активацией *in vitro* аллогенных смесей лимфоцитов. На основании таких исключений, как дети 6 и 7, в семье, указанной в табл. 133, предполагается, что активация в СКЛ контролируется сегментом хромосом HL-A, который находится за пределами интервала между LA и FOUR, ближе к FOUR. В этом отношении полной аналогии между H-2 и HL-A не существует, так как у мышей локус MLC находится между K и D близко к I_g. Следовательно, по аналогии с мышами нельзя полагать, что центромера в человеческой хромосоме находится ближе к FOUR.

¹ Обозначение «супертипические» прижилось, в отличие от «субтипические». —
Прим. ред.

Если припомнить то, что говорилось ранее, приходится прийти к выводу, что СКЛ пока еще относительно не изучена. Мы еще не знаем, насколько велик генетический сегмент, который контролирует СКЛ. Мы не знаем, состоит ли он из одного или нескольких цистронов, контактен он или рассеян. Мы не знаем также, что представляет собой его продукт или продукты. В качестве рабочей гипотезы, основанной главным образом на немногочисленных доказательствах того, что аллогенные сыворотки блокируют активацию в СКЛ, мы предполагаем что фенотип MLC (различия LD по терминологии Bach) проявляется как компонент клеточной поверхности, возможно, сходный по структуре с антигенами HL-A, но по какой-то причине неспособный индуцировать цитотоксические антитела. Другим важным, но пока еще косвенным указанием является сходство между MLC и Ig-1 по хромосомной локализации и блокированию аллогенными сыворотками.

Наконец, говоря об HL-A, я хочу остановиться на протяженности комплекса и количестве цистронов, составляющих этот необыкновенный «суперген». Частота рекомбинаций между FOUR и MLC, по-видимому, примерно такая же, как между LA и FOUR, следовательно, общая длина системы, вероятно, составляет не меньше 1,5%. На основании среднего количества хиазм, наблюдаемых при мейозе, т. е. 52, можно полагать, что человеческий геном соответствует длине $52 \times 1/2 \times 100 = 2600$ сантиморганн. Таким образом, чистота рекомбинаций 1,5% представляет $6 \cdot 10^{-4}$ общей длины карты. Содержание ДНК в человеческой гамете соответствует примерно $6 \cdot 10^9$ нуклеотидам, а следовательно, примерно $6 \cdot 10^6$ генам (если допустить, что на структурный ген приходится в среднем 500 пар). Эти вычисления подтверждают, очевидно, мнение, что в комплексе HL-A есть место для $6 \cdot 10^{-4} \times 6 \cdot 10^6 = 3600$ генов. Даже если согласиться с весьма скромной цифрой, недавно названной Cgick, этот участок должен включать по крайней мере несколько десятков структурных генов. Имеющиеся сейчас данные скорее подтверждают мнение, что каждый антиген HL-A соответствует одному полипептиду, а следовательно, одному цистрону. Таким образом, подавляющее большинство других генов комплекса либо не проявляется на клеточной поверхности лимфоцитов (единственная, хорошо изученная линия клеток у человека), либо, скорее, проявляется в виде структур, которые не распознаются современными серологическими методами (однако мой коллега Carboпага получил некоторые указания на существование аллоантител, блокирующих СКЛ и выявляемых при помощи непрямой иммуофлюоресценции). Как уже упоминалось, примерами таких генов являются MLC и Ig-1. Интересно было бы предположить, что все или большинство из этих сотен или тысяч генов родственны по своему происхождению, так как они образовались от какого-то общего предка в результате неравного кроссинговера, а затем дифференцирующих мутаций. Ввиду этого общего происхождения, они, вероятно, также родственны по функции, так как могут контролировать структуры и специфические активности клеточной поверхности. По-видимому, они по-разному проявляются в разных линиях клеток. На этой конференции нас интересуют больше всего иммуноциты, а следовательно, гены Ig, однако легко представить себе многие другие основные функции клеточной поверхности, например контактную ингибицию, сообщение клетки с клеткой, селективный транспорт и т. д.

Сохранение неравновесного сцепления между компонентами системы и поразительная аналогия между архитектурой хромосом у разных видов (две сцепленные серии H-антигенов с одинаковой частотой рекомбинаций, найденные у человека, мышей, обезьян-резус и собак) — вот еще два основания полагать, что главная система гистосовместимости млекопитающих

(позвоночных?) является «эпистатическим блоком генетической информации» (Fisher), которая остается компактной на протяжении эволюции, так как представляет собой какое-то интегрированное функциональное единство-видимому, являются системы иммуноглобулиновых цепей. Ввиду важности и сложных функций HL-A предполагаемых нами аргументов, можно предположить, что этот локус связан с рядом болезней, как нам пояснит вскоре Bodmer. Однако я хочу подчеркнуть, какие трудности предстают перед генетиком в этом случае.

Даже у таких аутбредных видов, как человек, генетический анализ не сложен, если изучается продукт, близкий к первичному действию гена, так как полипептид легко распознается в его аллельных вариантах (гемоглобин S путем пробы на серповидные клетки или электрофорезом либо определения последовательности аминокислот: антигены HL-A при помощи серотипирования). Однако, чем дальше от гена изучаемое проявление фенотипа, тем более становится неясной картина из-за действия других переменных факторов, исходящих из внешней среды и остального генома. Примером может быть австралийский антиген, упомянутый ранее Allison.

Когда мы установили, что существует связь между H-2, вирусным лейкомогенезом и иммунным ответом, мы решили изучить возможную связь между HL-A и так называемыми здоровыми носителями Aa. Blumberg доказал, что такое носительство отличается высокой концентрацией в семьях. Путем изучения 165 семей из Сардинии мы смогли подтвердить, что это индивидуальный способ реакции на вирусную инфекцию (вероятно, имеющий иммунологическую основу), который в значительной мере контролируется генотипом. Однако гипотезу простого аутосомального наследования можно было бы подтвердить только с помощью ряда сложных манипуляций для того, чтобы учесть неполную пенетрантность (от 100 до 20%) в зависимости от возраста, пола и, конечно, инфекции. Изучая расщепление в семьях, мы не нашли сцепления между носительством Aa и HL-A, однако мы не изучали эту ассоциацию на уровне популяций. Если бы мы изучали популяцию Турина, то, вероятно, нашли мы достоверную ассоциацию с некоторыми фенотипами HL-A, Rh или MN. Действительно, в Турине очень часты носители Aa среди иммигрантов из Сардинии (до 20% носителей среди молодых мужчин), но они очень редки среди местного населения (менее 1%). Мы можем только гадать о том, в какой мере эта разница обусловлена генетическими факторами, и в какой мере она зависит от социально-экономического статуса иммигрантов, которые принадлежат к менее обеспеченным кругам населения. Сардинцы весьма отличаются от жителей Северной Италии по частоте некоторых антигенов крови, поэтому обнаруженная связь была бы ложной и обусловленной этническими наслоениями (очевидно, мы нашли бы также связь некоторых биологических маркеров с матеральной необеспеченностью). Это один из возможных источников ошибок при изучении генетики человека, но по этой причине меня весьма интересует изучение иммунного ответа не только у инбредных линий мышей, но и у диких мышей Klein.

Выше я изложил некоторые наиболее важные, на мой взгляд, соображения, касающиеся генетики человека, которые могут дать направления дискуссии на этой сессии. Теперь Bodmer поделится с нами тем, что известно сейчас о связях между HL-A и болезнью.

Bodmer. На этой, 6-й, сессии я остановлюсь на проблемах, которые стоят перед теми из нас, кто изучает некоторые возможные аналоги мышинных моделей у человека. В частности, рассмотрю некоторые вопросы, возника-

юшне, когда мы ищем среди человеческих популяций связи между болезнями и системой HL-A, пользуясь в качестве моделей ситуациями на мышах, столь подробно рассмотренными на 5-й сессии. Первая подобная работа, которая дала интересные результаты и о которой я буду говорить ниже, была опубликована всего 5 лет назад Amiel. Думаю, я буду прав, если скажу, что в то время ни я, ни многие другие не оценили должным образом значения его данных во многих отношениях!

Прежде всего можно задать вопрос: почему мы должны искать признаки генетической восприимчивости к таким болезням, как лимфогранулематоз, лейкоз или аутоиммунные болезни, которым посвящены многие исследования по HL-A, особенно поскольку нет ясных доказательств, что эти заболевания имеют семейный характер в обычном смысле слова? Обычно, если мы хотим найти генетическую основу, то мы ищем значительную «концентрацию» болезни в семьях и пытаемся объяснить ее передачей одного или двух менделевских генов. Ясно, что в отношении лимфогранулематоза «концентрация» в семьях минимальна. Лимфогранулематоз встречается примерно в 5 случаях на 100 000 населения и, согласно опубликованным исследованиям, частота этой болезни повышена максимум в 2—3 раза среди близких родственников больного (Razis e. a. — «Ann. Int. Med.», 1959, v. 51, p. 933).

Тем не менее сейчас, по-видимому, имеются основания искать связи некоторых из этих болезней с генетическими маркерами. Я хотел бы остановиться на обосновании таких попыток.

Вполне очевидное объяснение состоит в том, что восприимчивость к болезням детерминируется многими генами, как и у мышей, о которых рассказал нам Lilly на 5-й сессии. В этих условиях концентрация болезни в семьях снижается из-за многофакторного генетического контроля болезни.

Второе обоснование того, почему можно искать генетический фактор, несмотря на отсутствие «концентрации» в семьях, заключается в том, что эффект гена или генов отнюдь не проявляется согласно закону «все или ничего». Влияние гена может сказаться в повышении тенденции к заболеванию или восприимчивости к инфекции. Как сказал по другому поводу председатель Serpellini, неполная пенетрантность гена может замаскировать явную «семейную частоту».

Третий фактор, который на мой взгляд особенно важен при упомянутых нами заболеваниях, состоит в том, что для развития болезни очень большое, может быть, решающее влияние имеет внешний компонент. Так, если мы говорим о болезнях, которые могут быть вызваны вирусом, то сам вирус является решающим внешним фактором. Например, контакт с вирусом сам по себе может происходить редко или даже при контакте с вирусом болезнь может развиваться в редких случаях. Вероятность того, что все соответствующие генотипы в семье будут находиться в контакте с этим агентом, может быть мала: таким образом, генетическая «концентрация» болезни может отсутствовать по чисто внешним причинам.

Тем не менее легко представить себе ситуацию, когда наличие определенного гена является абсолютно необходимой предпосылкой для того, чтобы вирусная инфекция вызвала болезнь, однако характер контакта с вирусом таков, что семейной «концентрации» не наблюдается, так как эффективный контакт с вирусом происходит редко. Следовательно, таковы некоторые из причин, по которым целесообразно искать связи между болезнями и определенными генетическими факторами даже без концентрации болезни в семьях.

Было проведено много исследований связей между группами крови АВ0 (и другими) с раком желудка и рядом других болезней. Сначала стимулом к подобным исследованиям послужило предположение, что если связи будут найдены, они, возможно, явятся указанием на те эволюционные силы, которые ответственны за сохранение полиморфизма групп крови. Однако задачей исследователей не была попытка объяснить связь с болезнью на молекулярном уровне. Возможно, в результате этого большинство исследований дало разочаровывающие результаты, либо сомнительные, либо таковые, которые с трудом поддавались трактовке. Может быть, единственная причина, заставляющая нас искать связи с болезнью какого-то генетического маркера (когда нет оснований ожидать функциональной связи между маркером и болезнью), заключается в том, что, возможно, существует один или несколько генов как-то относящихся к болезни, которые тесно сцеплены с изучаемым маркером. Это была бы форма ассоциации, обусловленная генетическим сцеплением, и одна из основных тем моего выступления, но я хотел бы рассмотреть ее в особом контексте.

Опыты на мышах, выявившие связи между различными заболеваниями и феноменами иммунного ответа с системой H-2, ясно говорят о целесообразности поиска связей с HL-A. По-видимому, действительно существуют основания ожидать связи между HL-A и болезнью, и мы, очевидно, не потерпим неудач, постигших тех исследователей, которые искали связи между другими полиморфизмами и болезнями у человека. Эта уверенность побудила нас всех определить частоту антигенов HL-A при различных заболеваниях. По крайней мере вначале эти заболевания отобрали, исходя из предположения, что они могут быть аналогичны тем болезням, которые у мышей оказались связанными с системой H-2.

Прежде чем подробно рассмотреть эти исследования и трактовку их результатов, я хотел бы остановиться на некоторых статистических и серологических источниках ошибок, возможных при поисках таких связей. Прежде всего нас больше всего беспокоила возможная необъективность в трактовке данных. Как пояснил нам председатель Serpellini, система HL-A действительно сложна. Описано около 30 антигенов, которые распределяются između двумя сериями, называемыми Foug и LA. Обычно мы ищем распределения всех этих антигенов и больных, страдающих данным заболеванием, и как-то сравниваем его с контролем. Можно вычислить величину χ^2 для того, чтобы установить, повышена или понижена частота каждого антигена у больных по сравнению с контролем? Если будет обнаружена статистически достоверная величина χ^2 , то значит мы нашли антиген, связанный с болезнью.

Статистические тесты таковы, что если мы получаем величину χ^2 , достоверную на 5% уровне, то это значит, что в среднем 1 раз из 20 такая же большая разница будет обнаружена, даже если распределение в контрольной группе и группе больных одинаково. Обычно принято считать, что если такая разница случайно возникает 1 из 20 раз, то эффект может быть реальным. Однако, когда мы определяем 20 антигенов, то при изучении связи болезни с 20 антигенами один из них может дать случайную разницу на 5% уровне достоверности между популяцией больных и контролем. Такой результат не будет достоверным, так как мы отбираем крайнюю разницу и, следовательно, обычные статистические тесты в принципе не применимы. Необходимо учитывать тот факт, что эта крайняя разница при оценке ее достоверности была отобрана.

Известны некоторые обычные стандартные статистические поправки. Проще всего, найденный уровень вероятности умножается на число исследо-

ванных антигенов. Возможно, поэтому первоначальные наблюдения, сделанные Amiel при лимфогранулематозе, игнорировались, что отчасти оправдано, так как по указанной мною причине это наблюдение не было истинно достоверным. Однако, как это часто бывает, когда к исследованиям приступают клиницисты, они игнорируют некоторые научные соображения, но в конце концов достигают правильного результата, как все мы убеждаемся позднее. Эту статистическую необъективность можно устранить двумя способами.

Один способ, как уже говорилось, — найти уровень достоверности, настолько высокий, что при внесении соответствующих поправок истинная достоверность не будет вызывать сомнений. Другой и, пожалуй, более убедительный способ заключается в том, что, если при начальном исследовании будет обнаружена повышенная частота данного антигена, надо провести повторные исследования, чтобы изучить динамику этого антигена у больных. Будет ли обнаружена повышенная частота этого антигена при повторном исследовании? Если да, то статистическая необъективность отпадает и статистические тесты данных, полученных при повторном исследовании, будут вполне достоверны.

Существуют еще две статистические или эпидемиологические проблемы. Одна, чрезвычайно важная проблема, упоминалась Serpellini. Это вопрос о правильном отборе контроля. Если популяция «больных», как, например, носители австралийского антигена среди сардинцев, относятся к подгруппе, в которой распределение антигенов иное, чем у «нормального» контроля, скажем, у европейской белой расы, то связь с этими антигенами будет ложной. Эта связь будет обусловлена полиморфностью популяции и не будет иметь определенной ассоциации с изучаемой болезнью. Поэтому чрезвычайно важно правильно отбирать контроль для сопоставления с популяцией «больных». Эпидемиологи обычно очень строго отбирают контроль как минимум по принципу возраста, пола, сроков и расовой группы. При сопоставлении частоты HL-A у «больной» и контрольной популяции, возможно, критерии могут быть несколько менее строгими, так как мы располагаем некоторой информацией о вариабельности частоты антигена HL-A у разных групп людей. Известно, что они не сцеплены с полом и что распределение у пожилых и молодых людей одинаково по крайней мере в пределах экспериментальной ошибки.

Основной фактор, влияющий на частоту HL-A, — это расовое распределение, т. е. та проблема, которой занялись мы, участники V Workshop по гистосовместимости. Таким образом, необходим контроль, подобранный по расовому происхождению исследуемых людей. Я полагаю, что другие эффекты невелики и необходимость более тщательного подбора контрольной группы, вероятно, слишком мала, чтобы стоило их изучать и таким образом для дальнейших исследований они не представляют реального значения.

Мне кажется, что при этих исследованиях надо уделить внимание еще одному фактору, а именно тому, что изучаемое заболевание может быть гетерогенным. Возможно, что существует связь только с субкомпонентом болезни. В таком случае связь может быть замаскирована, если не искать ассоциации с субкатегориями болезни. Например, если взять лимфогранулематоз, то пока еще неизвестно значение различных гистологических форм этой болезни и ее разных стадий. Не решен вопрос о том, страдают ли люди, болеющие в пожилом возрасте, в противоположность молодым другой формой лимфогранулематоза или же только другим проявлением той же болезни. Таким образом, гетерогенность болезни является важным факто-

ром, хотя он скорее приведет к маскировке ассоциаций, чем даст мнимые ассоциации.

Затем я хочу остановиться на некоторых серологических проблемах, связанных с изучением болезней. Уверен, что в дальнейшем эта тема вызовет более широкое обсуждение. Прежде всего вполне возможно, что на клетках больных с некоторыми заболеваниями проявляются антигены, специфические для этих заболеваний. Возможно, они не имеют отношения к антигенам HL-A, но, может быть, наши сыворотки, обычно применяемые для типирования HL-A, содержат антитела против них. При обычном типировании людей такие антитела, как правило, не выявляются.

Однако имеется более простой и легкий путь, с помощью которого такие антитела могут быть открыты. Для этого используют несколько сывороток для типирования каждого антигена. Когда один из них выделяется по частоте реакции у пациентов с данным заболеванием, ясно, что это отражает факт, что сыворотка прореагировала со «специфичностью болезни» больше, чем с определенным антигеном HL-A. Таким образом, я думаю, что, поскольку выявление антигенов, специфичных для болезни, является проблемой, они могут быть более легко выявлены, если исследование выполнено с учетом упомянутых выше замечаний, т. е., используя несколько сывороток для тестирования каждого антигена.

Вторая проблема, возможно, не так легко разрешимая, возникает, если имеется группа пациентов, у которых каким-то образом изменена реактивность в серологических тестах. В этом случае можно, например, выявить наличие перекрестно-реагирующих антигенов, которые в норме определяются у здоровых индивидуумов. В свою очередь это может привести к специфическим результатам типирования, являющимся артефактами и дающим очевидный рост ассоциаций с определенным антигеном.

Serpellini предполагает другие интересные возможности. Например, могут быть синергические связи с аутоантителами, присутствующими в сыворотке исследованных пациентов. Я думаю, чрезвычайно важно подчеркнуть, что если использовать несколько сывороток для каждого антигена, постоянство действия этих сывороток явится главным критерием того, что мы на самом деле выявляем антигены HL-A или что-то еще. Таким образом, если одна сыворотка, которая имеет, скажем, анти-HL-A1-антитела, постоянно демонстрирует взаимные реакции с определенными аутоантителами, а другая — нет, то это может иметь важное значение в отношении установления ассоциации между антигеном и болезнью.

Конечно, существует один точный путь для того, чтобы рассеять сомнения в отношении фенотипа HL-A индивидуумов, — это выявление фенотипов на основе генотипов при исследовании семей. Члены семьи, до того как заболевают, обычно являются нормальными индивидуумами. В таком случае легко установить, когда необходимо типирование по генам HL-A, а не только по фенотипу. Фенотип установить легко: часто так же легко установить генотип, который на самом деле нас интересует в отношении ассоциаций с болезнями.

Перед лицом всех этих проблем можно только удивляться как кто-то набрался смелости утверждать, что имеются какие-то статистически достоверные ассоциации между антигенами HL-A и болезнями.

Итак, хотелось бы начать с небольшой исторической справки в отношении лимфогранулематоза, который я использовал в качестве модели, потому что больше всего исследований было выполнено на этом заболевании. Я уже упоминал выступление Aniel на Workshop по гистосовместимости в 1967 г. об очевидном увеличении частоты приблизительно в 2 раза (с 23

до 51%) так называемого антигена 4с у больных лимфогранулематозом. Рациональным в этих исследованиях является то, что указанные ассоциации базировались на работе Lilly и соавт.; тем не менее многие из нас просто решили, что в результатах Amiel нет статистической достоверности. Эти данные игнорировались, но не слишком долго. Forbes и Morris («Lancet», 1970, v. 2, p. 849) и группа исследователей из Манчестера (Lewas e. a., — «Lancet», 1970, v. 2, p. 634) опубликовали работы, в которых также показали значительное увеличение частоты антигенов, родственных антигену 4с, в исследованиях Amiel. С этого времени выполнено по крайней мере 7 исследований по распределению HL-A антигенов у индивидуумов с лимфогранулематозом. Общее количество исследованных больных в настоящее время достигло более 680. Если эти серии не показывают статистической достоверности, то в дальнейшем, по-видимому, о них нечего говорить, но есть данные, с которыми следует считаться.

Прежде чем говорить об этом, я хотел бы немного рассказать о запутанной истории антигенов, связанных с 4с, потому что, с моей точки зрения, это чрезвычайно важно для интерпретации данных по лимфогранулематозу. Антиген 4с был впервые описан в Стенфорде моей женой, мною и Раупе. Он был впервые описан с помощью теста агглютинации и, возможно, эквивалентен тому, что сейчас называется HL-A5 (Bodmer e. a. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1966, v. 129, p. 473). Когда мы начали использовать цитотоксические сыворотки, отдельные сыворотки, которые лучше всего работали в тесте агглютинации для выявления антигена 4с, тем не менее не были активны в цитотоксических реакциях. Тогда мы использовали другую сыворотку (Refter), которая, как мы знали, на самом деле не была подобна использовавшейся ранее, но ее реакция также выявляла антиген, подобный 4с. Исследование, о котором мы сообщили вскользь в 1967 г. (Bodmer e. a. — «Histocompatibility Testing», 1967, p. 347; Munksgaard, Copenhagen), показало, что эта сыворотка не теряла активность при абсорбции. Таким образом, хотя все люди, у которых выявлен HL-A5, реагировали с этой сывороткой, наблюдались также люди, которые, хотя и не типировались по HL-A5, тоже реагировали с этой сывороткой. Следовательно, был сделан вывод, что в сыворотке присутствуют антитела, перекрестно-реагирующие с HL-A5 и другими антигенами. Впоследствии Thorsby и другие четко показали, что на самом деле было, по крайней мере, три специфичности, которые определялись этой сывороткой: первоначальная HL-A5, другая, названная W5, и та, которую называли W18.

Можно добавить, что имеется антиген, названный W15, который представляет значительный интерес, как это было сообщено Grumet с соавт. («New Eng. J. Med.», 1971, v. 285, p. 193) и Wolford с соавт. («Tissue Antigens», 1971, p. 168), так как его частота увеличивается при системной красной волчанке. Есть ряд доказательств о перекрестных реакциях W15 и других антигенов, хотя перекрестные реакции с участием W15 не являются слишком сильными. Четыре перекрестно-реагирующих антигена HL-A5, W5, W18 и W15 определяются как аллельные в локусе Four. Одним из самых спорных в данных об ассоциации 4с с лимфогранулематозом является вопрос, какой на самом деле из этих антигенов участвует в ассоциации.

Табл. 134 суммирует данные 9 из 10 исследований лимфогранулематоза, имеющихся в литературе. Не включено в таблицу первоначальное исследование Amiel, поскольку оно предполагает ассоциации с антигеном 4с. Все дальнейшие исследования, следовательно, можно рассматривать как попытку решения вопроса, действительно ли подобная предполагаемая ассоциация имеет место.

ТАБЛИЦА 134

Сравнение значений χ^2 для ассоциации между лимфогранулематозом и перекрестно-реагирующими антигенами 4с по сравнению со всеми другими антигенами HL-A^a

	Количество значений χ^2		
	менее чем 3,8	более чем 3,8	всего
4с-антигены (HL-A5, W5, W18 и W15)	19	9	28
Другие HL-антигены	116	11	122
	135	20	155

^a Для этой таблицы $\chi^2 = 9,25$ ($0,5\% > p > 0,1\%$). Данные взяты из следующих 9 работ: Zervas e. a. (1970); Morris, Forbes (1971), Coukell e. a. (1971) Thorsby e. a. (1971), van Rood, van Leuymen (1971), Kissmeyer-Nielsen e. a. (1971), Bertrams e. a. (1972), Falk, Osoba (1971), Jeannet, Magnin (1971).

Эта проблема носит статистический характер. Для каждого антигена в каждой работе можно вычислить χ^2 для проверки достоверности разницы по частоте антигенов среди больных лимфогранулематозом по сравнению с контролем. Контроль в этом случае обычно подбирался из представителей европейской расы; можно заметить, что почти все исследования проведены с европейской расой.

χ^2 имеет определенное распределение, которое указано в обычных статистических таблицах. Это распределение таково, что если бы между частотой антигена среди больных лимфогранулематозом и контролем не было бы разницы, то в среднем 1/20 всех величин χ^2 была бы больше 3,8, что соответствует 5% уровню достоверности.

А ргіогі я рассуждал следующим образом. Можно было ожидать ассоциации с антигенами 4с, следовательно, я отделил данные для этих антигенов от данных для других антигенов HL-A. Затем я построил простые таблицы, чтобы показать распределение величин χ^2 в 9 исследованиях для двух групп антигенов. Иными словами, в этих 9 работах проведено 28 сопоставлений между больными лимфогранулематозом и контролем по частоте антигенов 4с. Из 28 соответствующих величин χ^2 9 были больше 3,8 и 19 меньше 3,8. Если бы разницы по частоте этих антигенов у больных лимфогранулематозом и контролем не было бы, то относительное количество величин χ^2 больше 3,8 было бы равно 1/20, т. е. из 28 мы получили бы одну или две.

Что же сказать о величинах $\chi^2 > 3,8$ для других антигенов? Если обратиться ко всем остальным антигенам HL-A, изученным в этих 9 работах, то было сделано 127 сопоставлений и найдено 11 величин $\chi^2 > 3,8$. Таким образом, мы получаем частоту немного менее 10%. Эта частота достоверно превышает ожидаемые 5%. Однако она достоверно меньше, чем 9 из 28 величин, полученных при сопоставлениях по антигенам 4с. Иными словами, если проверять достоверность разницы между 9 из 28 величин и 11 из 27 величин, то мы получим $\chi^2 = 9,25$, т. е. высокодостоверную ($0,5\% > P > > 0,1\%$). Таким образом, если изучить распределение величин χ^2 в собранных данных, то мы найдем высокодостоверную разницу между распределением антигенов 4с по сравнению со всеми остальными антигенами. На мой взгляд, это действительно поддерживает мысль, что, по крайней мере, в проведенных работах по лимфогранулематозу имеются определенные достоверные ука-

зания на повышенную частоту того или другого из антигенов 4с. Мимоходом я могу заметить, что это еще не означает, что повышение частоты других антигенов недостоверно. В некоторых работах получены указания на то, что повышена частота также HL-A1 и/или HL-A8, однако эти изменения отнюдь не столь точно доказаны, как изменения антигенов 4с. Таким образом, я считаю, что, по крайней мере, в этом случае ввиду большого количества проведенных исследований обнаружена известная закономерность данных, указывающая на достоверную связь между повышенной частотой определенных антигенов HL-A и лимфогранулематозом. Видимо, эта связь не простая и касается не только одного антигена.

Но, прежде чем остановиться на возможных интерпретациях, я хотел бы вкратце сказать о том, что известно сейчас вообще о связях HL-A с болезнью. В табл. 135 сделана простая попытка подытожить данные по всем болезням, которые, насколько мне известно, были исследованы. Я попытался дать представление о количестве исследований каждой болезни, об антигенах и субъективную оценку постоянства результатов. Против некоторых предполагавшихся связей, например при инфекционном мононуклеозе, можно уже возразить. Болезни перечислены примерно в порядке достоверности данных.

ТАБЛИЦА 135

Опубликованные исследования связи между HL-A и различными болезнями

Болезнь	Число исследований	Замешанные антигены	Связь с болезнью
Лимфогранулематоз	10	HL-A5, W5, W15, W18	++
Системная красная волчанка	4	HL-A5, W5, W15	++
Злокачественная лимфома	2	HL-A12	+
Хронический гломерулонефрит	2	HL-A2	+
Острый лимфолейкоз	8	HL-A2, HL-12	+—
Хронический лимфолейкоз	3	(W5)	+—
Хронический миелоидный лейкоз	2	HL-A1, HL-A3, HL-A12(—)	+—
Множественный склероз	1	HL-A3 (HL-A2, W10, W18)	+
Множественная миелома	1	W18	+
Инфекционный мононуклеоз	1	W5	+
Псориаз	1	W17 (HL-A13, 10, 12)	+
Ювенильный диабет	1		—
Ревматоидный артрит	1		—
Астма	1		—
Энтериты	1		—
Хориокарцинома	3		—

Пока наиболее постоянные данные получены для лимфогранулематоза и волчанки. Проведено относительно много исследований лейкоза, но результаты их, по-видимому, сомнительны. Сделаны некоторые исследования особенно интересных болезней, например псориаза, результаты которых, как надо надеяться, будут вскоре подтверждены. Кроме того, существует несколько болезней, при которых нет никаких признаков связи. Мне кажется, что это наблюдение весьма отрадно. Эта сводка должна дать по крайней мере некоторое представление о диапазоне исследованных болезней и о накопленном объеме данных. Когда Сohn задает вопрос, зачем изучать человека, я могу ответить словами Роре, высказанными около 250 лет назад:

«Чтобы познать человечество, надо изучать отдельного человека». Здесь мы видим, как быстро собираются данные, относящиеся к человеку, если только есть основание надеяться, что они могут быть ценны.

Теперь я хотел бы вернуться к вопросу, почему при изучении связи лимфогранулематоза, видимо, найдена связь с набором родственных антигенов, а не просто с каким-то одним антигеном. Я думаю, что лучше всего интерпретировать эти данные, предположив связь не с самими антигенами, а с продуктами одного из сотен или тысяч локусов в системе HL-A, которые сцеплены с LA и FOUR или в комплексе H-2 с D и K. Обратимся опять к некоторым проблемам изучения связей, которые обусловлены сцеплением, т. е. к ситуации, которую мы уже детально обсуждали. Было отмечено, что сцепление может не обнаруживаться по связям на уровне популяций даже для тесно сцепленных генов, которые, конечно, дали бы явные ассоциации при обследовании семей. Вообще связи, обусловленные тесным сцеплением, могут быть сложными и переменными, так как они зависят от частоты соответствующих генетических комбинаций среди популяций.

Допустим, что в системе HL-A имеется определенный локус, скажем, локус DS-A (DS — восприимчивость к болезни), который связан с восприимчивостью. Допустим также, что восприимчивость определяется доминантным аллелем этого локуса DS-A1. Тогда связь с определенным антигеном HL-A, допустим HL-A5, должна заключаться в том, что генетическая комбинация или гаплотип с участием аллеля HL-A5 локуса Four и DS-A1 встречается значительно чаще, чем комбинация HL-A5 с другими аллелями DS-A или чем комбинация других антигенов HL-A с DS-A1. Иными словами, мы получили бы связь между влиянием этого аллеля DS-A1 на болезнь и наличием антигена HL-A5, так как генетическая комбинация HL-A5 с DS-A1 среди популяции имела бы большую частоту, чем другие комбинации, включающие аллель DS-A1. Связь вызвана неравновесным сцеплением между аллелем, контролирующим восприимчивость к болезни, и соответствующим аллелем локуса Four. Возможно, поэтому связь может быть не столь достоверной, как следовало бы ожидать. Мы находим ее только благодаря сцеплению гена, детерминирующего антиген с аллелем, контролирующим восприимчивость. Тот же вопрос можно задать, например, по отношению к связям между антигенами локуса Four и LA в человеческих популяциях. Несмотря на то что генетическое расстояние между LA и Four равно только 0,8% единиц рекомбинации, все же большинство пар антигенов, состоящих из одного антигена каждого локуса, не находится в достоверной связи. Конечно, некоторые пары связаны весьма достоверно. Например, известная HL-A1 и HL-A8 среди популяций европеоидной расы. В европеоидной расе известна также связь другой пары HL-A7 и HL-A3. Однако в общем это единственные пары антигенов, между которыми имеется достоверная связь среди популяций европеоидной расы. Другие пары не связаны, несмотря на тесное сцепление между этими локусами, именно по этой причине вначале предполагалось, что антигены серии Four и LA детерминируются отдаленными локусами.

То же самое, очевидно, можно было бы сказать и о связях между локусами DS-A и Four. Неравновесное сцепление может быть обнаружено только для некоторых антигенов локуса Four и некоторых аллелей локуса DS-A. Кроме того, неравновесное сцепление с антигенами локуса LA может отсутствовать. Мы безусловно знаем, что у представителей европеоидной расы HL-A5 не связан достоверно с каким-либо из антигенов локуса LA.

Таким образом, я считаю совершенно возможным, что связь болезни с антигеном 4с может объясняться связью каждого из соответствующих ал-

лелей с продуктом аллеля DS-A1, однако из многих локусов в системе HL-A; именно данный аллель DS-A1 находится в неравновесном сцеплении с каждым из 4 аллелей, соответствующих антигенам 4с.

Почему неравновесное сцепление распространяется больше, чем на один антиген? Одной из причин может быть общее эволюционное происхождение этих комбинаций перекрестно-реагирующего набора антигенов. Тот факт, что они вступают в перекрестные реакции, позволяет думать, что они имеют общее относительно недавнее происхождение и образовались в результате рекомбинаций между собой или с другими аллелями или мутаций (Bodmer. — «Nature», 1972, v. 237, p. 139). Затем связь аллеля DS-A1 с аллелем-предшественником того или другого из этих антигенов сохранилась на протяжении всего процесса образования антигенов 4с локуса Four. Для поддержания комбинаций, возможно, потребовалось легкое селективное взаимодействие между продуктом аллеля DS-A1 и четырьмя продуктами аллелей HL-A5, W5, W18 и W15. Кстати, тот факт, что неравновесное сцепление имеется с локусом Four, а не с локусом LA, позволяет думать, что локус DS-A находится ближе к Four, чем к LA.

Cohn. Считает ли Bodmer, что Four является единым цистроном?

Bodmer. Не обязательно, с теоретической точки зрения неважно — является ли Four единственным цистроном или скоплением цистронов.

McDevitt. Являются ли HL-A5, W5, W15 и W18 аллелями?

Bodmer. Да, они все аллели, так как мы не находим их вместе в одном и том же гаплотипе. Существуют стандартные способы вычисления относительно повышенной частоты болезни, связанной с данным фенотипом по сравнению с ее частотой в контрольной группе. Эти методы использовались в частности при исследованиях системы ABO (Cavalli-Skorza, Bodmer. — «The Genetics of Human Population». San Francisco, 1971). Если, например, частота одного из антигенов повышена примерно от 25% среди контроля до 50% среди больных, как это наблюдается при лимфогранулематозе, то относительное повышение частоты лимфогранулематоза среди людей с одним из антигенов 4с будет примерно втрое. Иными словами, частота лимфогранулематоза среди лиц с соответствующим фенотипом должна быть примерно в 3 раза больше, чем среди лиц с другими фенотипами. Надо подчеркнуть, что это относительное повышение не связано с геном DS-A-1, который дает этот эффект, а со сцепленным локусом FOUR. Действительно, допустив, что наличие данного аллеля является абсолютно необходимой предпосылкой для заболевания лимфогранулематозом, можно вычислить, какая величина неравновесного сцепления с соответствующими аллелями локуса FOUR дала бы только втрое повышение частоты. Согласно предварительным вычислениям, если бы неравновесное сцепление между данным аллелем DS-A1 и аллелями 4с было бы примерно таким же, как между HL-A1 и HL-A7, то все больные лимфогранулематозом обязательно были бы иметь аллель DS-A1 и тем не менее заболеваемость должна была бы быть только в 3 раза выше среди лиц с антигеном 4с. Это объясняется тем, что генетическая рекомбинация ведет к уменьшению эффекта связи.

Если бы связь с болезнью была обусловлена эффектом самого локуса Four, то повышение частоты аллеля у больных указывало бы на то, что этот эффект доминантный. Если бы эффект был рецессивным, то мы обнаружили бы снижение, а не повышение частоты, т. е. среди больных было бы меньше, а не больше людей с соответствующим антигеном, но если эффект обусловлен сцепленным локусом, то это разграничение отпало бы. Это объясняется тем, что аллель DS-A, который может находиться в неравновесном

сцеплении с одним или несколькими аллелями локуса Four, может быть либо рецессивным, либо доминантным. Действительно, можно было бы получить либо положительную, либо отрицательную связь с антигенами локуса Four вследствие нарушения равновесия сцепления с локусом Four независимо от того, является ли аллель DS-A доминантным или рецессивным. Таким образом, если объяснение, что эффект обусловлен сцепленным локусом, правильно, то мы не сможем установить, является ли эффект доминантным или рецессивным в зависимости от повышения или снижения частоты антигенов при изучаемой болезни.

Однако вопрос о доминантности или рецессивности важен, когда мы пытаемся объяснить связи с болезнями. Объяснения, предполагающие, что либо сами антигены HL-A, либо продукты тесно сцепленного локуса обладают молекулярной мимикрией по отношению к антигенам патогена (вируса) или находятся во взаимодействии с вирусными рецепторами, означают доминантный характер восприимчивости к болезни. С другой стороны, простейшая прямая модель механизма иммунного ответа, контролируемого локусом DS-A по аналогии с мышами и морскими свинками, соответствовала бы рецессивному характеру восприимчивости к болезни. Дело в том, что иммунный ответ, очевидно, был бы связан с устойчивостью против болезни и эта устойчивость должна контролироваться по доминантному типу. Однако можно представить себе более сложные гипотезы, которые предполагали бы доминантный иммунный ответ, связанный с восприимчивостью, например, болезнь могла бы быть связана с наличием ответа аутоантител или с образованием избытка иммунных комплексов. Возможно и другое, а именно, что исследованные больные, особенно пожилые, по существу представляют собой категорию, которая специфически сопротивлялась болезни и, следовательно, является резистентной, а не восприимчивой к болезни. Согласно этой гипотезе восприимчивые либо вымирают, либо не могут быть исследованы по другим причинам. Как отмечали Falk и Osaba («Lancet», 1971, v. 2, p. 1118), подобный механизм мог бы привести к различным типам связи для разных возрастных групп.

Таким образом, в общем я считаю, что, хотя исследования, проведенные на человеке, крайне интересны и поддерживают мысль о значительном и важном полиморфизме генов, влияющих на восприимчивость к болезни, они трудны и часто могут давать неясные результаты из-за своей сложности. Нашей задачей несомненно должны быть обследования семей, при которых можно было бы определить действие данных локусов без осложняющей роли внешних факторов или рекомбинаций на уровне популяции.

ТАБЛИЦА 136

Связь между HL-A и лимфогранулематозом в двух группах пациентов

HL-A	Нормальные лица европейской расы	1-я группа с лимфогранулематозом	2-я группа с лимфогранулематозом	Всего
	n=273	n=127	n=31	n=158
HL-A11	37 (13,6%)	36 (28,4%) ^a	1 (3,4%)	37 (22,8%) ^b
HL-A5	25 (9,1%)	16 (12,6%)	6 (19,4%)	22 (13,9%)
W5	25 (12,1%)	41 (32,3%) ^b	3 (9,7%)	44 (27,8%) ^a

^a P < 0,001;
^b P < 0,0005;
^в P < 0,01.

Morris. Я хотел бы остановиться на некоторых аспектах наших собственных исследований, подчеркивающих то, что уже упоминал Bodmer, и добавить, быть может, одно или два замечания. Назову некоторые болезни, которыми мы интересуемся, и их возможные связи с HL-A. Прежде всего я хочу остановиться на лимфогранулематозе и некоторых аутоиммунных болезнях.

В табл. 136 приведены данные, собранные нами по лимфогранулематозу. Здесь показана частота антигенов HL-A, которые, по нашим наблюдениям, связаны с болезнью, а именно HL-A11, W5 и, возможно, HL-A5. Данные относятся к нормальной австралийской популяции европеоидной расы. Группа больных лимфогранулематозом по существу состоит из двух исследованных групп, результаты ранее уже были опубликованы. Поэтому я объединил их в одну группу (лимфогранулематоз 1) (Forbes, Morris. — «Lancet», 1970, v. 2, p. 849, 22; Forbes, Morris, — «J. Clin. Invest.», 1972, v. 61, p. 1156). В этой группе обнаружено весьма достоверное повышение частоты HL-A11 и W5. Третья группа (лимфогранулематоз 2), которая также исследуется с одновременным изучением гистосовместимости, не подтверждает (по крайней мере пока) повышенной частоты W5, установленной в двух предыдущих исследованиях. Как видно, из табл. 137, если объединить всех этих больных, т. е. рассматривать 158 больных лимфогранулематозом, то мы наблюдаем значительно повышенную частоту W5 и HL-A11. На основании всего уже сказанного, а также опубликованных источников, я думаю, что при лимфогранулематозе повышена частота антигенов, связанных с 4с.

ТАБЛИЦА 137

Результаты исследований связи HL-A
и различными болезнями

Болезнь	Число случаев	Связанная HL-A-специфичность
Лимфогранулематоз	158	W5(4с) HL-A11?
Злокачественная лимфома	134	HL-A12
Острый лимфобластный лейкоз		Нет
Инфекционный мононуклеоз	110	Нет
Аутоиммунные болезни	107	HL-A8? Системная красная волчанка, волчаночный гепатит W-15? Системная красная волчанка W-15? Ревматоидный артрит HL-A1? Волчаночный гепатит
Рак легкого	56	Нет

Конечно, при изучении болезни необходимо исключить, что повышенная частота данной специфичности или антигена обусловлена самой болезнью и что проявление антигена является следствием патологического процесса. Это можно было бы установить при обследовании семей. Мы смогли обследовать 40 семей больных лимфогранулематозом, в которых мы определили

генотипы HL-A членов семей. В это число входит 8 семей, в которых больной имел W5, и 12 семей, в которых больной имел HL-A11, т. е. те два антигена, которые имеют повышенную частоту при лимфогранулематозе. Во всех этих случаях аллель, контролирующей антиген, расщеплялся по закону Менделя. Таким образом, мы можем исключить, что антиген приобретен вследствие болезни (Forbes, Moggis. — «J. Clin Invest.», 1972, v. 51, p. 1156). Для сведения тех из вас, кто не является клиницистом, я хочу подчеркнуть, что лимфогранулематоз — болезнь весьма гетерогенная в отношении гистологических и клинических признаков и возраста, в котором она наступает.

Bodmer считал, что это обстоятельство не столь уже важно для общего изучения связи лимфогранулематоза с HL-A и, возможно, он прав. Однако я думаю, что при изучении лимфогранулематоза все же надо учитывать это и накапливать данные с соответствующей точки зрения. Например, у женщин с узелковой, склерозирующей формой лимфогранулематоза мы нашли весьма достоверное повышение частоты еще одного антигена — HL-A7. Частота HL-A11, повышенная во всех группах, особенно велика среди женщин, опять-таки страдающих узелковой склерозирующей формой лимфогранулематоза.

Эти данные заслуживают внимания, так как гистология, возможно, отражает иммунный ответ организма. Прежде всего надо помнить, что гистологическое определение лимфогранулематоза меняется в течение болезни от ее начала до терминальной стадии. Далее, двум гистологам очень трудно договориться о форме лимфогранулематоза. Следовательно, в идеале все гистологические исследования должны проводить одна и та же группа гистологов. Именно с такой группой мы и работали.

Важное значение имеет возраст, так как по возрасту больных лимфогранулематозом можно разделить на две группы: в первой группе болезнь наступает до 50 лет, во второй — после 50 лет. Наши данные не позволяют сделать каких-либо замечаний по этому поводу, так как 97% наших больных относились к первой группе. Однако такую информацию могли бы выявить комбинированные данные международного исследования, которое проводится сейчас в рамках Воркшопа по гистосовместимости.

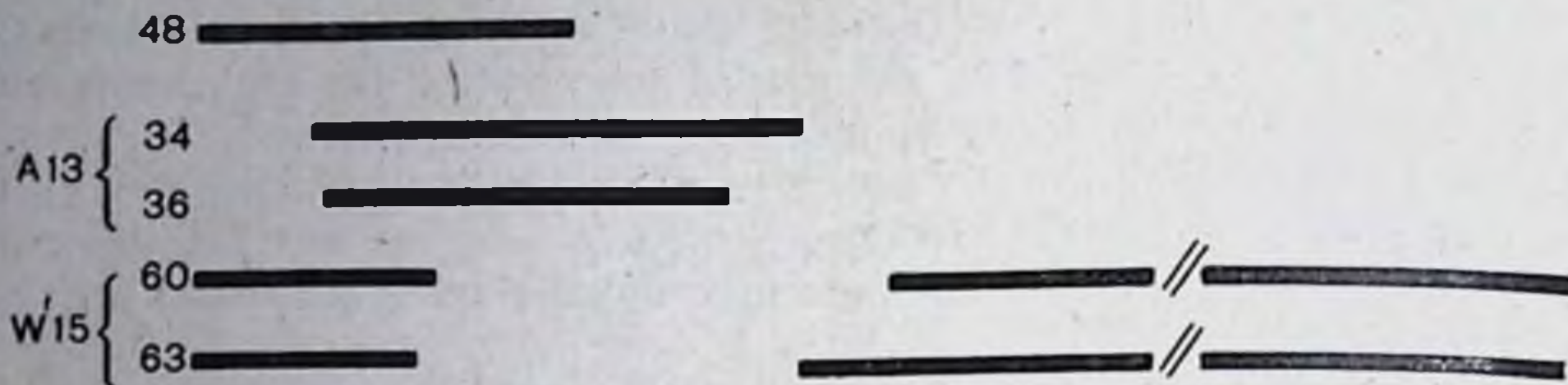
Наконец, я хотел бы остановиться на серологическом определении этих антигенов. На основании печатных работ или выступлений специалистов по HL-A у многих, по-видимому, сложилось впечатление, что эти специфичности точно определены. Я хотел бы подчеркнуть, что это далеко не так. Это стало ясно в процессе наших новейших антропологических исследований, к которым привлекаются все специалисты по HL-A в рамках Воркшопа по гистосовместимости. Уже не говоря о том, что это послужило поводом для путешествия во многие романтические страны земного шара, была получена также очень ценная информация, и, несомненно, после завершения анализа всех данных о серологических специфичностях HL-A объем этой информации еще значительно пополнится.

Я хотел бы рассказать об одной из сывороток, которой мы пользовались для выявления W5 при лимфогранулематозе. Эта сыворотка дает совершенно особую реакцию с клетками горцев Новой Гвинеи.

На рис. 80 показана так называемая сывороточная карта, на которой реакции этой сыворотки W548 (условное обозначение лаборатории по гистосовместимости) сравниваются с рядом других сывороток, выявляющих другие специфичности HL-A. Длина горизонтальных столбиков означает сумму положительных реакций каждой сыворотки против группы лиц европеоидного происхождения в нижней половине таблицы и горцев — в верхней по-

Сыворотка W=5

№ 214—горцы Новой Гвинеи



№ 100 (европеоидная раса)

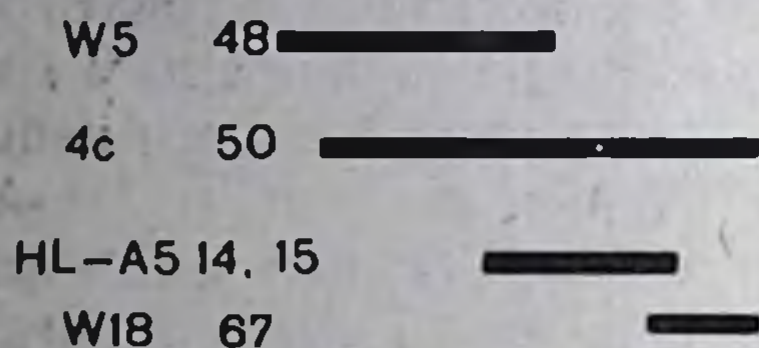


Рис. 80. Распределение положительных и отрицательных цитотоксических реакций. Сплошные линии отображают положительные реакции между сывороточными реагентами и лимфоцитами тестированных индивидов. Эти линии показывают число индивидов, чьи клетки реагируют положительно. Длина линии пропорциональна числу обследуемых индивидов.

ловине. Указаны только положительные реакции каждой сыворотки, отрицательные реакции не изображены. На полных детальном картах, которыми привыкли пользоваться наши коллеги по семинару, исследованные лица были бы указаны в нижней части рисунка, причем лица с положительными реакциями были бы объединены вместе.

Остановимся на нижней половине рис. 80. Мы многие годы применяли мельбурнскую сыворотку 48, которая выявляет у лиц европеоидного происхождения W5 и дает положительные результаты примерно у 10% популяции. Следующая сыворотка — это сыворотка Bodmer, называемая Rafter, мы ее называем 4c. Она включает почти все реакции сыворотки 48, за исключением первой, которая, судя по нашим прежним наблюдениям с этими сыворотками, вероятно, является технической ошибкой. В эту специфичность 4c входят реакции сывороток Воркшопа, определяющие HL-A5 и W/18.

Председатель Serpellini. Я хочу задать вопрос, ясен ли всем рис. 80? Понимают ли присутствующие, что означают эти столбики и в чем общий смысл этого изображения?

Morris. Некоторые из присутствующих, видимо, не понимают этого рисунка, поэтому лучше я объясню его. Мы исследовали эти сыворотки против одного и того же набора лимфоцитов 100 лиц европеоидного происхождения и объединили вместе лиц, дающих положительные реакции. Вы могли бы представить себе на месте столбиков ряд плюсов, а пустые места равноценны минусам для каждой сыворотки. Панель лимфоцитов испытуемых пронумерована от 1 до 100 в нижней части рисунка. Следует надеяться, что это поможет вам составить требуемое представление.

Если применить ту же сыворотку 48 у горцев Новой Гвинеи, у которых совершенно нет 8 из основных антигенов HL-A европеоидной расы, мы убедимся, что сыворотки, определяющие 4c, HL-A5 и W18, совершенно нере-

активны, ни одной положительной реакции они не дают. Однако сыворотка 48 опять-таки реагирует примерно с 10% популяции Новой Гвинеи, но эти реакции полностью сходны с реакциями сывороток, определяющих специфичности HL-A13 и W15. Эти необыкновенные серологические данные я объясняю тем, что сыворотка 48 выявляет не только факторы, составляющие W15, но и некоторые детерминанты, составляющие HL-A13 и W15 у горцев Новой Гвинеи. Они не могут быть теми же факторами, из которых состоят эти специфичности у лиц европеоидной расы, так как у этой расы сыворотка 48 не реагирует с W15 или HL-A13. Я привожу здесь всю эту информацию, так как она позволяет предполагать, что именно дополнительные детерминанты, выявляемые сывороткой 48 у новогвинейцев, возможно, и связаны с лимфогранулематозом.

Покончим на этом с лимфогранулематозом и остановимся вкратце на аутоиммунных болезнях и HL-A. В табл. 138 приведены результаты определения частоты антигенов HL-A у основных групп больных, страдавших системной красной волчанкой, ревматоидным артритом и волчаночным гепатитом. Мы не смогли подтвердить повышенную частоту W15, о которой говорил Bodmer, но частота W5 и HL-A8 повышена. Grumet и соавт. в своей первоначальной работе («N. Engl. J. Med.», 1971, v. 285, p. 193) также обнаружили повышение HL-A8. При волчаночном гепатите мы обнаружили крайне высокую частоту HL-A1 и 8 (см. табл. 138). Конечно, группы больных невелики, но у всех больных с аутоиммунными болезнями частота HL-A8 была повышена. Я думаю, что интересно, так как частота HL-A8 повышена, хотя и не всегда достоверно, у лиц, сильно отвечающих на иммунизацию флагеллином и у больных, дающих положительные кожные пробы на антиген вирусного паротита, туберкулин, кандидин, трихофитин и стрептококковую варидазу. Повышенная частота HL-A8 связана с астмой у детей, которая, очевидно, имеет иммунное происхождение (Thorsby e. a. — «Tissue Antigens», 1971, v. 1, p. 147). На мой взгляд, эти наблюдения, которые, конечно, носят предварительный характер, заслуживают дальнейшего изучения.

ТАБЛИЦА 138

Корреляция между гаплотипом HL-A, системной красной волчанкой, ревматоидным артритом и волчаночным гепатитом

Болезнь	Специфичность	Отношение положительных тестов ко всем исследованиям	Достоверность
Системная красная волчанка	HL-A8	11/23	$p < 0,05$
	W5	8/23	$p < 0,01$
	W15	1/16	Не достоверно
Ревматоидный артрит	W15	6/25	$p < 0,005$
Волчаночный гепатит	HL-A1	13/18	$p < 0,001$
	HL-A8		$p < 0,001$

Наконец, я хочу обратиться к совершенно иной области, а именно связи между HL-A и способностью организма вырабатывать антитела против антигенов HL-A. Мы исследовали всех людей, у которых обнаружили антитела против HL-A вследствие беременности, гемотрансфузий, пересадки органов и иммунизации лимфоцитами или кожными трансплантатами. Всего мы собрали более 250 сывороток. Для многих из них мы знали генотип как

донора, так и реципиента. Остановимся на данных о фенотипах лиц, образующих антитела.

Около года назад van Rood обнаружил возможную связь между W15 и способностью вырабатывать антитела против антигенов HL-A. Мы не смогли подтвердить эту связь в своей очень разнообразной группе, но, как видно из табл. 139, мы нашли весьма достоверное влияние HL-A на образование одного вида из этих антител, а именно антитела против HL-A2.

ТАБЛИЦА 139

Связь между гаплотипом HL-A и способностью продуцировать анти-HL-A антитела

	HL-A3		NL-A3/11		NL-A9					
	+	-	+	-	+	-				
Анти-HL-A2	+	26	19	+	35	10	+	3	42	
	-	27	70	-	37	60	-	25	72	
	$\chi^2 = 11,78$ $p < 0,001$		$\chi^2 = 19,318$ $p < 0,001$		$\chi^2 = 7,088$ $p < 0,01$					

В табл. 139 приведены данные, говорящие о значительном повышении частоты HL-A3 или перекрестно-реагирующего с ним антигена HL-A11 у 45 человек, которые продуцировали антитела, направленные против HL-A2. Возможно, что у этих же людей снижена частота HL-A9.

Контрольная группа не вполне приемлема, так как это не группа лиц, иммунизированных HL-A2, у которых антитела против HL-A2 не вырабатывались. Это 217 доноров крови, из которых мы исключили всех лиц, положительных по HL-A2, и всего осталось 97 человек. Мы видим высокодостоверную связь между способностью вырабатывать антитела против HL-A2 и наличием HL-A3. Это еще не доказывает связи между HL-A и Ig-геном, но возможно, что такая связь существует. Мы пытаемся точнее изучить это наблюдение путем иммунизации в семьях, типированных по HL-A. Данные, полученные нами, подтверждают то, что я уже сказал. Безусловно, очень легко вызвать образование антител против HL-A2 у лиц, положительных по HL-A3, и трудно — у лиц, отрицательных по HL-A3.

Председатель Serpellini. Есть ли у других участников конференции информация об образовании гуморальных антител и фенотипе HL-A продуцентов антител? Если нет, то я хотел бы упомянуть о работе моих коллег в Турине и Парме, которые проследили за образованием антител более чем у 50 добровольцев, иммунизированных переливанием цельной крови. Мы обнаружили некоторые интересные данные, но самое достоверное наблюдение ($P = < 0,01$) состоит в том, что реципиенты, имеющие антиген HL-A3, слабо отвечают на антигены серии FOUR и то лишь после многих переливаний. Это особенно интересно, так как определяется ответ против антигенов другой серии и, следовательно, на него вряд ли может повлиять перекрестная реактивность между иммуногеном и тканями отвечающего. Однако, следуя совету Bodmer, мы повторим наблюдения еще над 50 людьми, прежде чем слишком восхищаться своими результатами. Второе исследование будет начато, исходя из априорного допущения, что реципиенты, положительные по HL-A3, являются слабо отвечающими. Недавно мы получили новые данные, указывающие на связь между HL-A и иммунным ответом. При сопостав-

лении различных генетических маркеров среди популяций (опять-таки в Сардинии), на которые до последнего поколения оказывала сильное селективное действие малярия (об этом говорит также высокая частота врожденных гемопатий), и контрольных популяций такого же происхождения, но живущих в высокогорной местности, где нет малярии, мы обнаружили расхождения между «малярийной» и «немалярийной» популяциями, значительно большие, чем можно было бы ожидать на основании случайного дрейфа, только по талассемии, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе и локусу FOUR (Piozza e. a. — «Histocompatibility Testing», 1972), но не по 18 другим маркерам (LA, Rh, MN, Gm, и т. д.). Весьма интересно, что локус FOUR, по видимому, следует за двумя гемопатиями, которые, несомненно, являются селективными маркерами. Мы исходили из следующей рабочей гипотезы: а) малярия является сильным селективным агентом, который может поддерживать полиморфизм по таким летальным мутациям, как талассемия; б) в естественных условиях, как неоднократно отмечал Allison, иммунные механизмы являются мощной защитой от малярии, вероятно, взаимодействующей с гемопатиями в процессе защиты; в) следовательно, малярия должна селективировать какие-то особые аллели Ig и, таким образом, в процессе эволюции ее должны сопровождать тесно сцепленные гены HL-A. Если Ig-гены на карте у человека близки к MLC, как доказывает Bach на мышах, то станет понятно, почему эффект достоверен только для локуса FOUR, но не для локуса LA. Мы должны повторить сначала исследования на других популяциях, возможно, африканских племенах, которые изучал Allison с высокой и низкой частотой гемоглобина S.

Постепенно накапливаются данные, указывающие на связь между HL-A и иммунным ответом и HL-A и болезнью. Тем не менее, как подчеркивал Bodmer, мы не должны увлекаться погоней за статистически достоверными связями, которые, возможно, не представляют большого биологического или клинического значения. Так, например, как отмечал Bodmer, частота лимфогранулематоза в популяции вообще равна $5 \cdot 10^{-5}$, а у сибсов-больных повышена лишь немного, скажем, в 5 раз, т. е. $25 \cdot 10^{-5}$. Однако, вероятность того, что сибсы имеют тот же генотип HL-A, равна $25 \cdot 10^{-3}$. Многие из найденных связей касаются болезней, которые прямо влияют на лимфоцит (например, системная красная волчанка). Невольно приходит мысль: может быть, некоторые корреляции вызваны не случайными ошибками типирования, например, когда исследуемые клетки покрываются сублитическими дозами аутолимфоцитотоксина. Конечно, это объяснение не относится к тем случаям, когда типирование по HL-A подтверждено путем генетического анализа семей, как в некоторых работах Morris.

Van Rood. Я хотел бы теперь объединить различные данные и различные мнения, изложенные на этой сессии. Для тех, кто не участвует в международных исследованиях по HL-A, наши выступления, может быть, менее интересны, чем другие исследования с более теоретическим уклоном. К тому же у нас значительно меньше разногласий, чем, например, у исследователей, изучающих рецепторы T-клеток. Чем может объясняться эта разница? Во-первых, допустим, что наша область более проста. Мы изучаем человека и нам всегда говорят, что эта область настолько сложна, что нельзя надеяться получить какие-либо значимые результаты. Таким образом, это объяснение маловероятно.

Вторая возможность состоит в том, что эта область «подвластна доминирующему самцу», подобно семьям диких мышей. Кругом довольно много доминирующих мужчин, но я не думаю, что однородность результатов можно объяснить только их силой. Поэтому остается лишь одно возможное

объяснение, а именно, мы регулярно обмениваемся реагентами и, может быть, именно поэтому наши выводы совпадают. Я хотел бы остановиться на одном фактическом наблюдении. Bodmer упомянул мимоходом нечто весьма важное, по моему мнению, а именно, имеющиеся данные говорят о том, что частота генов HL-A одинакова у старых и молодых людей. Если бы это было действительно так, то было бы весьма печально, так как это означало бы, что влияние данного комплекса проявляется только по окончании репродуктивного возраста. Мне кажется, что Amos и Yipis получили данные, указывающие на обратное, а именно, что между частотой генов у молодых и старых людей имеется разница. Таким образом, это возможный предмет обсуждения, и, может быть, у кого-нибудь есть данные по этому вопросу? Кроме того, принято считать, что, помимо локуса или скопления локусов FOUR и LA, имеются также локусы вне FOUR и LA. Я хотел бы напомнить данные, рассмотренные на 2-й сессии и относящиеся к случайно найденной единственной семье с двумя кросинговерами. По крайней мере в этой семье можно считать, что локусом, определяющим активность в СКЛ, не был ни локус FOUR, ни локус LA; скорее это был локус, называемый нами MLC, который, по-видимому, находится ближе к FOUR, чем к LA. Я считаю, что это одно из действительно новых наблюдений, сделанных при исследованиях человека, которое представляется довольно достоверным.

На этой, последней, сессии выяснилось еще одно важное обстоятельство, возможно, соответствующее предыдущим наблюдениям. Я имею в виду тот факт, что большинство связей с болезнями, по-видимому, касается антигенов серии FOUR, а не LA. Если это так, то на первый план выступает действительно интересный вопрос о том, насколько эффективно типирование антигенов серии FOUR и LA в отношении информации о локусе MLC. Опять-таки по этому вопросу имеются фактические данные, показывающие, что типирование эффективно примерно в 10—20% случаев. Таким образом, если этот локус MLC расположен рядом с локусом «восприимчивости болезни» или тождествен ему, мы не можем надеяться на большую частоту корреляции чем 10—20%. Естественно, возникает вопрос о сыворотках, которые используются в совместных работах по данной проблеме.

Некоторые сыворотки, возможно, вступают в перекрестную реакцию с продуктом как локуса FOUR, так и локуса MLC, и исследование семьи не поможет установить это, так как в общем эти локусы в семьях расщепляются вместе. Следовательно, можно предположить, что распознается только антиген серии FOUR. Избыток положительных реакций, благодаря которому данные, полученные с какой-то сывороткой, становятся достоверными, может объясняться не специфичностью серии FOUR, а перекрестной реактивностью антигенов FOUR и MLC. Я не утверждаю, что это так, а хочу лишь сказать, что мы должны помнить о таком объяснении. Наконец, отсюда вытекает мое последнее замечание, а именно: для оценки связи с болезнью пригодны только прямое тестирование продукта локуса MLC.

В беседе со мной Вепасеггаф рассказал о том, как он представляет себе идеальную программу исследований. В частности, он хотел определить MLC у больных раком молочной железы, а также подобрать большой контрольный материал. Я заметил, что для этого может потребоваться около 10 лет. Однако все же данная мысль в принципе верна. Теперь нам нужно получить точную информацию о полиморфизме локуса MLC. Как я говорил на 2-й сессии, план наших опытов основан главным образом на работах Serrellini и его группы с ингибцией MLC. Возможно, что это приведет к успеху. В некоторых отношениях, быть может, неудачно то, что мы начали с лимфогранулематоза, так как частота лимфогранулематоза очень низка, об этом

говорил Bodmer. Хочу подчеркнуть, что наши ошибки никогда не поздно исправить. Может быть, лучше изменить направление нашей работы и изучать, например рак молочной железы, так как его частота более высокая.

Председатель Serpellini. Может ли Bach объяснить, почему в своей схеме HL-A он поместил FOUR и LA в положениях, обратных общепринятым?

Это не только вопрос личных вкусов. У нас нет даже оснований считать, что LA равнозначно D, а FOUR равнозначно K. Проявим некоторое терпение и подождем, когда будет установлена последовательность аминокислот.

Bach. Я хочу сделать несколько замечаний в ответ на выступление van Rood. Во-первых, связь между HL-A и тем, что я назвал лимфоцитарными локусами, LD-локусами, контролирующими активность в СКЛ, возможно, сильнее, чем указывает van Rood. В поисках антигенов HL-A мы встречаемся с лицами, не состоящими в родстве, клетки которых не дают стимуляции в СКЛ. Кроме того, если попытаться сопоставить число антигенов, по которым различаются неродственные лица, и степень стимуляции в СКЛ, то исследования Sorensen в Копенгагене, а сейчас некоторые исследования Segall в нашей лаборатории показывают, что неродственные лица, клетки которых стимулируют, несмотря на серологическую идентичность по HL-A, в среднем вызывают несколько меньшую стимуляцию, чем клетки неродственных лиц с разным гаплотипом HLA.

Второй вопрос — это локализация локуса LD. Я, конечно, согласен с van Rood, что этот локус должен находиться слева от FOUR, если написать LA и Four так, как я написал их. Однако на основании исследований собственной группы van Rood вместе с Eisjvoogel, а также некоторых других исследований, я не хочу исключать возможности того, что локусы, контролирующие реакцию в СКЛ, могут включать локусы LD между FOUR и LA.

Согласно данным van Rood, при наличии различий гаплотипов по серологическим антигенам, когда он предполагает рекомбинацию между локусами FOUR и LD, слева от Four реактивность все еще имеется в небольшой, но достоверной степени. Возможно, что эта стимуляция вызывается локусом LD между двумя серологически определяемыми локусами, как по нашим данным у мышей. Наконец, я хочу упомянуть, что, мне кажется, аллели локусов LD можно определить. Следуя совету Serpellini, можно было бы попытаться получить блокирующие антисыворотки, которые блокировали бы специфический продукт локуса LD.

Конечно, эта попытка может быть проведена на мышах. При исследовании на человеке, может быть, возникнут трудности. Для этой цели можно было бы воспользоваться клетками в качестве реагента и сочетанием СКЛ и специфичностью гибели клеток, которое Serpellini назвал клеточным лимфолизисом. Вместе с Sondel я думал о том, можно ли получить клетки-киллеры, которые специфически определяли бы продукты локуса LD.

Такие клетки могли бы быть использованы подобно антисывороткам в виде групп реагентов, определяющих антигены, или их можно было бы абсорбировать по примеру Брондза в Москве путем абсорбции на монослоях.

Председатель Serpellini. Отвечая Bach, я хотел бы сказать, что прежде всего мы не знаем, важны ли LA или FOUR как антигены для СКЛ. Согласно моим наблюдениям, различия по LA и FOUR (антигены SD по терминологии Bach) имеют некоторое отношение к степени активации в СКЛ, но меньшее, чем к эффекторной фазе ЦЭЛ. В этой фазе они, по-видимому, определяют специфическое распознавание мишени. Я хотел бы знать, как представляет себе Bach роль продуктов локуса MLC, т. е. антигенов LD по его выражению, в активации СКЛ. Являются ли они стимулирующими антигенами или они связаны с иммунорецепторами отвечающих лимфоцитов

или же это просто различия строения поверхности двух реагирующих партнеров?

Vach. Мне кажется, возможным две трактовки этого вопроса. Первая состоит в том, что серологически определяемые антигены являются частью молекул, стимулирующих в СКЛ. При различии по Ig они могут только стимулировать или же сами служить рецепторами. Согласно другой трактовке, серологически определяемые антигены совсем не стимулируют. Мне кажется, Serpellini поднял очень важный вопрос.

Мы хотели бы предположить, что продукты локуса LD являются продуктом Ig-гена, т. е. продукты Ig-гена важны не только в качестве распознающих молекул, но и в качестве антигенов, распознаваемых в СКЛ и составляющих по крайней мере часть антигенного спектра, который распознается.

Pincus. Как клиницист я, безусловно, согласен с Bodmer, что для изучения человечества надо изучать самого человека. Однако с точки зрения наших концепций об антигенах гистосовместимости и болезнях следует помнить некоторые данные, изложенные на 5-й сессии в отношении мышинных моделей.

В связи с возможной ролью вирусов при человеческом лейкозе надо помнить, что естественные вирусы мышинного лейкоза, видимо, присутствуют в животных от рождения и могут быть латентными во всех мышинных клетках. Признаков «горизонтальной передачи» натуральных вирусов мышинного лейкоза нет. Таким образом, внешние обстоятельства, отмеченные Bodmer, возможно, влияют на проявление вируса и последующий лейкемогенез. Однако контакт с вирусом в традиционном смысле этого слова, может быть, не является важным.

В известных работах Lilly, в которых ясно доказано, что локус Rgv-1, сцепленный с H-2, имеет основное значение для того, разовьется ли лейкоз у гибридов линий C3H и C57BL при введении вируса Gross пассажа A, автор проявил большую проницательность и признал, что в детерминировании лейкемогенеза участвует второй локус Rgv-2. Локус Rgv-2 не сцеплен с H-2. Возможно, локус Rgv-2 тождествен локусу Fv-1, обсуждавшемуся на 5-й сессии. Независимо от этого локус Fv-1 является основной генетической детерминантой лейкемогенеза или лимфомы у мышей, которая не сцеплена с главной системой гистосовместимости. Конечно, у нас нет маркеров для картирования локуса у человека, так как вирус человеческого лейкоза или лимфомы еще не выделен. Выявление локуса, влияющего на болезни, не сцепленного с тканевой совместимостью, позволяет подойти к дальнейшему изучению полигенного контроля лейкемогенеза.

Наконец, я хотел бы привести пример локуса гистосовместимости, который на первый взгляд, казалось бы, не так уж и важен для восприимчивости к болезни. В опытах с вирусом лучевого лейкоза, выделенным от мыши C57BL(H-2^b, Fv-1^b), заболеваемость лейкозом среди мышей C57BL составила около 90%, среди мышей C3H (H-2^k, Fv-1ⁿ) заболеваемость лейкозом равна примерно 30%. Однако среди мышей C3H·SW (H-2^b, Fv-1ⁿ) частота снижается еще более, до 10%. Мыши C3H и C3H·SW различаются только по IX группе сцепления, содержащей H-2, поэтому наличие аллеля H-2^k, очевидно, более благоприятно для развития лейкоза, чем аллеля H-2^b, несмотря на то, что частота лейкоза среди мышей C3H равна только 30%. Мы считали бы, что первичная генетическая детерминанта лейкемогенеза при использовании В-тропного вируса лучевого лейкоза находится в локусе Fv-1, который, как уже говорилось, не сцеплен с H-2. Как C3H, так и C3H·SW резистентны (Fv-1^b) по этому локусу. Тем не менее сцепленный с гистосовместимостью аллель H-2^k «допускает» лейкемогенез у мышей

СЗН в противоположность СЗН·SW, хотя заболевает только 30% мышей. В этом случае влияние Н-2 имеет не только биологическое, но и статистическое значение, которое понятно, так как имеются генетические детерминанты. Этот пример касается относительно простой системы инбредных мышей. Обе основные открытые до настоящего времени детерминанты, связанные с мышинным лейкозом Fv-1 и Н-2 (Rgv-1), характеризуются доминантностью по признаку резистентности. Если данные, полученные на мышах, у которых найдено несколько локусов резистентности, перенести на аутбредную популяцию, то представляется маловероятным, что какой-либо особый локус в полигенной системе означал бы появление аллеля восприимчивости более чем у 30 — 40% популяции. Это никак не умалило бы значения указанного аллеля, способствующего восприимчивости к болезни.

Morris. Я все еще не могу разобраться в отношении одной концепции прямо связанной с этой конференцией. Насколько я понял, Klein утверждал, что у диких мышей MLC не коррелирует с выживаемостью кожных трансплантатов. Мы знаем, что у человека при родстве донора и реципиента выживаемость кожных и почечных трансплантатов коррелирует с серологическим подбором по MLC и HL-A.

Если донор и реципиент не родственны, то между выживаемостью кожных трансплантатов и MLC или HL-A корреляции нет, если только донор и реципиент не идентичны по HL-A, как указывает van Rood. Наоборот, при пересадке почек наблюдается умеренно выраженная связь с HL-A, по крайней мере, так я установил. Мне кажется, что у нас пока нет адекватных данных относительно MLC при пересадке почек. Можно было бы продолжить эти наблюдения, добавив к ним результаты пересадки ткани у крыс. Далее я хотел бы узнать, что представляет собой главная система тканевой совместимости. Это целый хромосомный сегмент, включающий локусы MLC, Iг, D и K у мышей, и MLC, Iг, LA и FOUR у человека, как указывает Simonsen, или, может быть, локусы D и K у мыши и MLC, LA и FOUR у человека просто сцепленных с гистосовместимостью, а гистосовместимость в свою очередь определяется продуктом Iг-гена. Это могло бы объяснить расхождение между MLC, серологическим типированием и выживаемостью тканевых аллотрансплантатов, если донор и реципиент не состоят в родстве.

Председатель Serpellini. Morris поднял очень важный вопрос, которому следовало бы посвятить совершенно особое совещание. Есть ли другие вопросы по основным темам?

Vach. Мне кажется, что ссылка на Klein приведена неправильно. Он утверждал, что при наших опытах на инбредных линиях не найдено явной корреляции главным образом потому, что в одной комбинации B10·A(2R) = B10·A(4R) с односторонней стимуляцией в СКЛ не было отторжения кожных трансплантатов. При других серологически идентичных комбинациях, когда имеется серологическое тождество и стимуляции в СКЛ [мутант H(g1) когда имеется серологическое тождество и стимуляции в СКЛ (мутант H(g1) с исходной линией B6 и комбинация AQR = 6R], была обнаружена как стимуляция в СКЛ, так и отторжение кожных трансплантатов.

Van Rood. Я повторяю то, что сказал на 2-й сессии, а именно: между идентичными по HL-A неродственными людьми, по-видимому, существует достоверная корреляция между выживаемостью кожных трансплантатов и реактивностью в СКЛ. Чем ниже реактивность СКЛ, тем дольше держится кожный трансплантат, чем выше реактивность, тем меньше выживаемость трансплантата.

Bodmer. Я хочу сделать некоторые замечания в связи с новыми вопросами, поднятыми в дискуссии. Очень интересны данные Serpellini по раз-

личиям частот антигенов HL-A, что может быть связано с различной заболеваемостью малярией. В большинстве исследований связей между HL-A и болезнью пока изучались болезни, вероятно, не представляющие большого значения для эволюции, так как они редки или наступают в позднем возрасте. Предполагаемая связь HL-A с малярией подчеркивает, что можно найти связи со значительно более важными болезнями (с точки зрения естественного отбора) и что эти связи могут иметь довольно большое влияние на эволюцию системы HL-A.

В отношении вопроса о других локусах я указывал, что мы всегда должны предполагать, что изучаем полигенные эффекты. Мы были бы весьма счастливы, если бы участники конференции могли сказать нам, какими маркерами следует пользоваться для выявления других локусов, возможно, участвующих в ответе на вирус. Насколько нам известно, основным кандидатом является HL-A, поэтому мы ищем связи с ним. Ясно, что надо также изучать локусы Gm и Inv. Очевидно, при обследовании семей надо было бы изучать все известные полиморфизмы, так как можно было бы случайно обнаружить новые сцепления.

По-видимому, стоит отметить, что в первых двух опубликованных исследованиях по волчанке изучался W15, входящий в тот же комплекс антигенов 4с, который связан с лимфогранулематозом. В двух последних работах, которые были опубликованы в виде рефератов, указывалась возможная связь с HL-A5 и W5. Представляется возможным, что при волчанке имеются связи с тем же набором антигенов, что и при лимфогранулематозе. В своем исследовании волчанки мы пытались установить частоту гаплотипов у больных, чтобы выяснить, имеется ли связь с каким-то определенным гаплотипом. Мы не нашли повышенной частоты определенного гаплотипа, включающего W15. Таким образом, можно полагать, что связь существует только с антигенами локуса FOUR. Если правомерно объяснение, предполагающее сцепленные локусы, то это вновь подчеркивает тот факт, что существует равновесное сцепление с локусом Four, а не с локусом LA. Поэтому DS-A, очевидно, расположен ближе к FOUR, чем к LA, хотя мы не знаем, по какую сторону локуса Four его следует поместить.

По вопросу о корреляции с возрастом я сказал бы, что проведенные исследования семей не выявили нарушений расщепления по антигенам HL-A. Думаю, это означает, что, если распределение антигенов у нормального контроля изменяется с возрастом, то это изменение невелико и значительно меньше, чем возможный эффект болезни.

Мне кажется, надо очень осторожно интерпретировать данные по MLC у неродственных лиц, идентичных по HL-A. Эффект ряда аллелей, которые могут существовать у этого локуса в популяции, очень трудно отличить от эффектов равновесного сцепления. Об этом говорил Shreffler во время нашей беседы. Если между локусом MLC и локусом FOUR имеется неравновесное сцепление, то это уменьшает предполагаемое количество аллелей, которые могут существовать в локусе MLC. Если невозможно, полностью идентифицировать аллели, то, мне кажется, полностью смешиваются два эффекта, т. е. число полиморфных аллелей и степень неравновесного сцепления.

Van Rood. Я полностью согласен с последним замечанием Bodmer. В отношении корреляции между фенотипом HL-A и возрастом я хотел бы отметить, что все имеющиеся данные получены при изучении европеоидной расы. Однако ее представители живут в искусственной среде. В Средней Африке дело обстоит иначе. Для того чтобы получить действительно ценную информацию по этому вопросу, мы должны были бы изучить разные возраст-

ные группы и частоту антигенов HL-A у племен, живущих в первобытных условиях.

Водмер. Однако у нас есть информация о первобытных популяциях, например о пигмеях. Пока мы еще не изучили влияние возраста, но, несомненно, имеется очень большая разница. Даже если обратиться к примеру, упомянутому Allison, т. е. серповидноклеточной анемии, хотя мы и видим достоверную разницу по частоте соответствующего гена в зависимости от возраста, эффект этот не велик.

Таким образом, я согласен, что можно найти различия, зависящие от возраста. Если, однако, возрастные различия, обусловленные естественным отбором, имеют такой же порядок величины, как степень связи с болезнью, то, очевидно, на практике связь с болезнью не удастся использовать, так как эффект был бы слишком малым.

Председатель Serpellini. Как генетик я согласен с Кандидом Вольтера, что «мы живем в лучшем из миров». Я верю в дарвиновский отбор и считаю, что генетические системы в дикой популяции в естественных условиях являются лучшими из всех возможных «коллекций генов», учитывая прошлое любой группы. За исключением явно летальных генов (даже эти гены могут быть выгодны для населения в целом, например аномальный гемоглобин в малярийной местности), мы не можем сказать, полезен ген или вреден. Что касается иммунного ответа, то селекция по набору Ig-генов, направленная к одному типу ответов, вероятно, была бы вредной для индивида и для всей популяции. Таким образом, человек либо не может отвечать на антигены тканевой совместимости и тогда умирает от рака, либо у него слишком развит иммунный надзор, и он заболевает аутоиммунной болезнью. Специализация иммунного ответа с популяции против наиболее распространенных патогенов, например, малярийного плазмодия, может быть «оплачена» худшей защитой против каких-то других агентов, например онкогенных вирусов.

КОММЕНТАРИИ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ КОНФЕРЕНЦИИ МЕЛВИНОМ КОНОМ

Примечание редактора

При планировании конференций в таких быстро развивающихся и продуктивных областях, как иммунология, организаторы стремятся завершить их четкими и лаконичными формулировками, подводящими итоги всему достигнутому. Однако мы признаем, что такие попытки в целом были мало удачными, поэтому мы вместо них решили дать критический анализ или обобщить мысли и концепции, выявившиеся после этих 3 дней свободных дискуссий. Мы обратились с просьбой к доктору Melvin Cohn взять на себя эту задачу и после обсуждения с нами он дал согласие.

Его импровизированный комментарий в заключении 6-й сессии, основанный на записях, которые он делал в процессе дискуссии, оказался прекрасным, но все же обобщения, к которым стремились он и редакторы, в этом комментарии отсутствовали. Поэтому мы договорились о том, чтобы Cohn взялся за это поручение заново. Он получил позднее полностью отредактированные протоколы конференции вместе с таблицами и рисунками и смог приступить к работе более вдумчиво и без спешки.

Как могут убедиться читатели, эта работа оказалась крайне сложной и трудоемкой, однако, на мой взгляд, ему весьма удался критический анализ конференции. Не все будут согласны со всеми тезисами Cohn, но тем не менее он оказал нам огромную услугу, так как тщательно отделил все допущения, слишком часто принимаемые на веру, от установленных фактов, и теории, основанные на логическом осмыслении фактов, от простого описания наблюдавшихся явлений.

От лица всех читателей мы хотим выразить благодарность и глубокую признательность доктору Cohn за его труд и за тот «иммунологический подвиг», который он совершил.

Вступление

Когда улеглось возбуждение, вызванное высокой концентрацией фактического материала, не удивительно, что я сделал попытку построить объединяющую теорию. Мною руководит ряд соображений. Прежде всего все хотели бы проникнуть в иммунную систему глубже, не ограничиваясь установленными в настоящее время экспериментальными данными. Во-вторых, мы должны стремиться к тому, чтобы уже известные факты не ввели нас в заблуждение. В-третьих, нам нужны четкие теоретические рамки и общая система терминов для того, чтобы делиться друг с другом своими данными и мнениями, особенно теперь, когда ясно, что неологизм, предложенный каким-либо автором, может быть интерпретирован другими так, как это вовсе не предполагалось.

Я подчеркиваю большое значение конкурирующих теорий. Было бы глупо попытаться быть единственным мудрецом. Перепрыгивая с факта на

Классификация

Сессия	Положение	Стр.
I	Гены иммунного ответа разделяются на 4 категории, из них 3 изучены в эксперименте:	
	А. Общий доминантный ответ.	315
	Б. Специфический рецессивный ответ.	315
II	В. Специфический доминантный ответ.	316
	Специфический доминантный ответ контролируется 4 несцепленными локусами, двумя для легких цепей $Ig-V_k$ и $Ig-V_\lambda$ и двумя для тяжелых цепей $Ig-V_H^B$ и $Ig-V_H^T$:	316
	А. Если справедлива модель соматической мутации, то можно предсказать, что специфические доминантные Ig -гены являются V -генами.	317
III	Б. Локус $Ig-V_H^B$ проявляется на B -клетках.	318
	В. Локус $Ig-V_H^T$ проявляется на t -клетках*.	319
	Модель ассоциативного распознавания проявления Ig -генов:	320
IV	А. Роль t -клетки, где проявляется $Ig-V_H^T$, заключается в регуляции свой — чужой.	322
	Б. Роль B -клетки заключается в эффекторных функциях.	324
	В. Замечания о функции t - и B -клеток:	327
V	1) t -клетка является антигенчувствительной клеткой, а не эффекторной клеткой;	329
	2) Иммунный паралич наступает вследствие инактивации антигенчувствительных T - и B -клеток через взаимодействие антигена с рецептором;	329
	3) общее отличие по доминантному ответу мышей Biozzi, исследуемых путем сравнения сывороточных антител с клеточным иммунитетом, еще не доказывает дифференциального влияния генов слабого и сильного ответа на B - и t -клетки.	330
VI	Продукт Ig -локуса, проявляющийся в T -клетках, является иммуноглобулином, подобным IgM (ассоциативные антитела):	332
	А. Доводы за это положение.	334
	Б. Доводы против него.	334
VII	В. Другие взгляды на рецептор T -клеток.	337
	Три свойства рецептора T -клеток:	339
	А. Соотношение T — B асимметрично:	
VIII	T -клетка необходима для индукции ответа как T -, так и B -клеток, но не наоборот:	339
	1) опыты Shearer с (T, G) -А- -Л и (F, G) -А- -Л у мышей;	340
	2) опыты Вепасеггаф с ГА и ГАТ у морских свинок;	343
IX	3) попутные замечания по локусам не $Ig-V_H^T$;	345
	4) T -клетка обязательна для индукции синтеза всех классов иммуноглобулинов B -клетками, включая IgM .	347
	Б. Диапазон и степень специфичности рецепторов T -клеток не меньше, чем рецепторов B -клеток.	347
X	Различен словарь:	353
	1) $Ig-V_H^T$ проявляет аллельное исключение;	355
	2) «независимость от тимуса» не является основной отличительной чертой;	357
XI	3) имеющиеся исследования специфичности не позволяют делать выводов о наборе специфичностей рецепторов B - и t -клеток.	361
	В. Сцепление генов K и D , как и генов Ss и Slp с $Ig=I$, случайно.	363
	Генетика аномальной индукции иммунного ответа	368
XII	А. Попытка Gritter навязать переключение от IgM и Igg слабо отвечающим животным	368
		369

* Термин « t -клетка» объясняется автором ниже. Прим. ред.

Сессия	Положение	Стр.
	Б. Анализ генерализованного аутоиммунитета, представленный Bretscher.	370
	В. Болезни аномального иммунного ответа (лейкоз, лимфоцитарный хориоменингит, фенотип NZB).	370
	Г. Мнение о том, как нарушается толерантность «к самому себе».	372
	Д. Экспериментальные ситуации с аномальной индукцией иммунного ответа, например стимуляция лектином и липополисахаридом, аллогенные болезни, СКЛ.	374
	Е. Анализ толерантности у аллофенных мышей, представленный Allison.	375
VII	Болезни и иммунный ответ у человека.	378
VIII	Заключение.	380

факт, подобно новичку-йогу на горячих углях, я хочу, чтобы читатель также прошел это испытание огнем. Быть может, это новый путь к нирване.

Сознаю, что этот анализ будет нелегко прочесть, однако надеюсь, что большинство читателей дочитает его до конца. Я полагаю, что наступило время, когда следовало бы проверить, какие из наших широко распространенных концепций основаны на общих принципах, поэтому мне кажется, что попытка разобраться в моих доводах не будет бесплодной. Сознательно, многие из своих аргументов я продолжил до крайнего предела, чтобы заострить проблемы и возможные их решения. Классификацию, приведенную ниже, надо рассматривать только как руководство для чтения, так как в тексте нет четких делений. Отчасти это объясняется тесной взаимосвязью между всеми факторами, детерминирующими проявление генов иммунного ответа, а отчасти моей неспособностью писать иначе.

Центральная проблема, стоявшая перед этой конференцией, — это роль генов в определении иммунного ответа. Самым сложным аспектом проблемы является регуляция различия своего и чужого. В процессе эволюции произошла селекция многих различных систем распознавания. Особенностью иммунной системы является то, что специфическое распознавание — это свойство, которое может индуцироваться и парализоваться, в зависимости от условий прежнего контакта животного с данным антигеном или родственными ему антигенами. Иными словами, набор иммунологических специфичностей, проявляемых индивидом, т. е. различие своего и чужого, не закодирован в генах половых клеток. Этот набор приобретается. Таким образом, перед нами стоит новая проблема соматической эволюции и классическая проблема дифференцировки.

Мы попытались разделить специфическую и общую отвечаемость при помощи молекулярного ножа (мутации), которым мы производим микрооперации на генах половых клеток. Нашим экспериментальным материалом служат 2 животных, отличающихся друг от друга по одному или нескольким продуктам, закодированным аллельными генами. Мы пытаемся добиться того, чтобы животные отличались только по одной паре аллелей, а затем определяем по фенотипу, каков продукт гена и его функция.

Это один из примеров классической методологии биологов, а именно удаление части всей системы для того, чтобы обнаружить, какие возникнут нарушения. Прежде всего мы характеризуем фенотип путем предъявления

животному панели антигенов и изучения ответа в отношении уровня (высокого или низкого) и класса продуцируемых сывороточных антител, а также явлений клеточного иммунитета (РТПХ и СКЛ).

1. КАТЕГОРИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА

Рассматривая генетику иммунного ответа, мы прежде всего можем сделать два вывода, а именно: установить, является ли способность к ответу антигенов (специфический ответ), или большинства или даже всех антигенов (общий ответ). Существуют четыре возможности: общий рецессивный, общий доминантный, специфический рецессивный и специфический доминантный ответ. В эксперименте изучено только три последних варианта, хотя существование общего рецессивного ответа можно предполагать, и его обнаружение было бы весьма поучительно, так как дало бы нам основной ключ к контрольным хромосомным механизмам иммунного ответа, указав на специфические репрессорные белки.

Парадоксальным открытием является специфический доминантный ответ, поэтому я буду говорить главным образом о нем. Однако хочу начать с некоторых замечаний об общем доминантном и специфическом рецессивном ответе.

А. Общий доминантный ответ

К категории доминантного общего иммунного ответа относятся:

Пример мышей со слабым и сильным ответом, приведенный Biozzi (сессии 3 и 5).

Не рассмотренные нами случаи мутаций гипофизарной карликовости у мышей.

Различные агаммаглобулинемии у человека и сцепленный с X-хромосомой иммунный ответ у мышей.

Сильный и слабый ответ мышей только по классу иммуноглобулинов IgE, рассмотренный Levine (сессия 3).

Ответ мышей на собственные антигены, т. е. аутоиммунитет (5-я сессия и 6-я), пример, который может ввести в заблуждение.

В дифференцировке иммунной системы есть много этапов, которые могли бы быть заблокированы мутацией структурного гена, кодирующего мембранный белок или константную область тяжелой либо легкой цепи. Мутации, блокирующие развитие тимуса, могут снять всю реактивность на какой-либо антиген. Мутации, влияющие на развитие антигенчувствительных клеток костномозгового происхождения, могут снять всю эффекторную, но не кооперативную активность иммунной системы. Мутации, затрагивающие константную область легкой или тяжелой цепи, могут нарушить синтез только одного класса иммуноглобулинов и уничтожить опосредованную им эффекторную активность. Например, делеция гена, кодирующего константную область тяжелой цепи IgA или IgE, исключит продукцию этого класса антител независимо от того, каким антигеном иммунизировано животное. В общем, однако, изучаемые нами мутации проявляются не по принципу «все или ничего» (как должна была бы проявиться делеция). Они более или менее эффективно инактивируют функцию продукта гена, и мы вынуждены работать с сильно- и слабоотвечающими животными. Используя мутации, влияющие на общий доминантный ответ, можно было бы узнать многое о пути онтогенеза, механизме индукции и о том, как выполняют свои функции антитела.

Б. Специфический рецессивный ответ

В категорию специфического рецессивного ответа входит ответ на антигены, которые очень сходны с собственными и, следовательно, способны вызывать иммунопаралич. Чаще всего это явление наблюдается с антигенами, которые полиморфны у данного вида, например, лица с группой крови А отвечают на иммунизацию группой В, а лица с группой крови В отвечают на иммунизацию группой А. Гибрид с группой крови АВ не отвечает ни на А, ни на В. Ответ специфичен и рецессивен. Известно множество примеров этого явления. Ответ на любой антиген, который является аллотипическим вариантом у данного вида, относится к этой категории. Следовательно, если рассуждать по аналогии, то локус Ig-2, сцепленный с геном окраски агути, контролирующей, как первоначально указывалось, специфический рецессивный ответ мышей на эритроцитарный антиген (Ea-1^u), может быть еще не исследованным примером специфической регуляции ответа и толерантности.

Генетика специфического рецессивного ответа, обусловленного толерантностью, может быть коварной. Если изучать ответ против идиотипа исследуемого антигена, который представляет собой антитела к полиморфному собственному компоненту мембраны, например, против H-2, то ответ может показаться доминантным. Представим себе животное А, продуцирующее антитела к В, но не антитела к А, вследствие толерантности, и животное В, продуцирующее антитела к А, но не к В, вследствие толерантности. Если воспользоваться в качестве антигена антителами к В, то животное А будет отвечать слабо, а животное В — сильно. Наоборот, если антигеном являются антитела к А, то животное А будет отвечать сильно, а животное В — слабо. Гибрид (АВ)F₁ будет отвечать сильно, и вырабатывать антитела против идио-типа как к анти-А, так и к анти-В. Таким образом, ответ может быть доминантным и контролироваться генами, кодирующими разницу собственного компонента АВ, например H-2. Я понимаю, что этот пример мог бы привести к осложнениям, если бы он был осуществлен в эксперименте буквально так, как описано. Однако, по существу к этому сводится эксперимент Lindenmann. Речь идет не о каком-то новом принципе генетической регуляции ответа. Скорее я хочу предупредить, что перед нами может возникнуть ситуация «двойного блефа», требующая разделения двух этапов. Я вернусь к этому очень важному опыту в другой связи, так как он имеет отношение к вопросу об использовании тестов клеточного иммунитета для определения характера рецептора t-клеток. Я обозначаю популяцию клеток, чувствительных к антигену, тимусного происхождения, функция которых заключается в ассоциативном распознавании (кооперации) строчной, а не прописной буквой «t». Причины этого станут ясны, когда я перейду к рис. 84 из раздела 5.

В. Специфический доминантный ответ

Специфический доминантный ответ является феноменом, так как степень ясности в наших трактовках наблюдений этого феномена точно отражает наши понятия о происхождении и проявлении специфичности антител. Особи инбредных линий отвечают различным образом как в количественном, так и в качественном отношении на определенные антигенные стимулы, причем ответ воспроизводим. Если бы этот феномен был ограничен только одним или двумя антигенами, он был бы не таким поучительным. У многих видов специфический доминантный ответ наблюдается для различных антигенов.

Начнем с объяснения доминантности, а затем рассмотрим характер продуктов I γ -локусов.

Я могу представить себе только два «универсальных» механизма, посредством которых гены могли бы контролировать специфический иммунный ответ (я пользуюсь словом «универсальный» для того, чтобы подчеркнуть, что aргюгi представляется много механизмов регуляции специфического ответа, если он наблюдался у одного вида только для одного антигена). Эти два универсальных механизма представляют собой либо толерантность, либо существование структурных генов, кодирующих рецепторы на антиген-чувствительных клетках.

Как я уже отмечал, вообще, механизм толерантности должен привести к специфическому рецессивному ответу. Тот факт, что способность к ответу является доминантной, еще не исключает механизма толерантности. Можно представить себе несколько механизмов, посредством которых доминантный ответ мог бы определяться толерантностью. Необходимо только, чтобы тест-антиген напоминал собственную детерминанту, отсутствующую у отвечающего родителя и у отвечающего гибрида, но имеющуюся у неответающего родителя.

На конференции 1970 г. в Brook Lodge по иммунному надзору в связи с этим вопросом обсуждалось возможное существование доминантной толерантности и был сделан вывод, что, если бы все аллофенные мыши (тетра-парентальные), полученные от отвечающих и неответающих родителей, были отвечающими, то можно было бы убедительно возражать против моделей «толерантности». Теперь мы знаем, что аллофенные мыши способны к ответу, но этот довод несколько ослаблен тем, что у них наблюдается ауто-иммунитет (см. раздел VI, E). Однако маловероятно, что многочисленные известные различия в ответе на случайно отобранные антигены могут быть обусловлены толерантностью. Следовало бы ожидать, что гены, обуславливающие различия в ответе, должны были локализоваться по всему геному, а не в локусе I γ -1 как это обычно наблюдается (раздел II, B). Следовательно, я охотно иду на аналогию и соглашаюсь, что в случаях, рассмотренных здесь, доминантный ответ не обусловлен толерантностью. Однако, если бы возникла парадоксальная ситуация, мы должны были бы пересмотреть этот вопрос для данного антигена просто потому, что специфический доминантный ответ вследствие толерантности не только может существовать теоретически, но и мог бы проявить механизм регуляции проявления поверхностных антигенов.

II. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ДОМИНАНТНЫЕ ГЕНЫ I γ ЯВЛЯЮТСЯ V-ГЕНАМИ

Перед нами остается второе предположение, что специфический доминантный ответ обусловлен структурными I γ -генами, кодирующими рецепторы на антигенчувствительных клетках. В-клетки проявляют иммуноглобулиновые рецепторы, следовательно, гены I γ детерминирующие их специфичность, должны быть известными генами вариабельной части (V) иммуноглобулинов κ и λ , несущих аллотип тяжелой цепи. Было предложено четыре разных интерпретации только в отношении генов I γ кодирующих рецепторы t-клеток. Эти интерпретации таковы. Рецепторы на t-клетках являются:

1) иммуноглобулинами, кодируемыми теми же тремя локусами, которые проявляются в В-клетках;

2) иммуноглобулинами, кодируемыми двумя локусами легких цепей κ и λ и новым локусом тяжелой цепи, проявляющимся исключительно в t-клетках;

3) белками, которые не являются иммуноглобулинами, так как известные локусы для цепей κ , λ , несущих аллотип, не кодируют эти белки;

4) теми же иммуноглобулинами, которые проявляются в В-клетках, однако специфичность их изменяется продуктами Ig-локуса.

В самой простой форме, согласно этим интерпретациям, ожидаемое общее число Ig-локусов, контролирующих специфический доминантный ответ, равно 4 или меньше, т. е. это локусы для κ , λ тяжелых цепей, несущих аллотип, плюс один новый локус, кодирующий, как указано выше, смену специфичности Ig.

В основном в нашей дискуссии рассматривались эти четыре трактовки, однако основные разногласия между нами не касаются характера рецепторов t-клеток. Ни одна теория ответа не будет опровергнута в зависимости от выбора того или другого предположения, так как любому белковому рецептору мы приписали бы свойства, необходимые для выполнения физиологической функции. Однако, как я докажу, мы не можем рассматривать фенотипическое проявление локуса Ig, не указав своей теоретической системы отсчета в отношении происхождения разнообразия как индукции иммунного ответа, так и иммунного паралича.

Хорошей отправной точкой был бы вопрос, насколько разумным а priori представляется, что Ig-гены являются V-генами половых клеток. Ответ на этот вопрос зависит от того, какая модель разнообразия имеется в виду?

А. Модель соматической мутации предсказывает, что Ig-гены должны быть V-генами

Какова роль V-генов половых клеток и V-генов соматического происхождения в распознавании у животного?

Я рассмотрел модели генов зародышевых клеток (Hood, Talmage. — «Science», 1970, v. 168, p. 325) и модель «гиперрекомбинации» (Gally, Edelman. — «Nature», 1970, v, 227, p. 341) в других своих работах (Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v, 190, p. 529; Cohn. — Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms. Lee. a. Pollak, eds., Australia and New Zealand Book Company, Sidney, 1972). Основная трудность этих моделей в предложенном виде состоит в том, что они не учитывают проблемы селекционных воздействий на V-гены половых клеток. По-видимому, эта проблема решается допущением, что общая потенция индивида эффективно отвечать (более 10^6 антител) проявляется независимо от того, имеется ли соматическая антигенная селекция.

Если у животного в случайном порядке возникает большой диапазон специфичности распознавания, так что общая потенция к ответу у каждого животного проявляется независимо от того, имеется ли антигенная селекция или нет, то еще не сразу можно прийти к выводу, что структурные V-гены половых клеток могут контролировать специфический ответ на большое разнообразие антигенов. Дело в том, что, как правило, индуцированные антитела (ассоциативные или эффекторные) должны быть ограничены по своей специфичности для того, чтобы была заметна разница ответов. Не удивительно поэтому, что сторонники теории «генов половых клеток» или «гиперрекомбинации», обсуждая происхождение разнообразия, никогда не учитывали специфический доминантный ответ. Ограниченного ответа на полидетерминантный антиген нельзя ожидать, если не рассматривать специфические модели селекционных воздействий на V-гены половых клеток, которые вызвали бы ограничения. Обратимся к яркому примеру ограниче-

ния. С-углевод пневмококка имеет много потенциальных детерминант, так как является сложной структурой. Однако, при инъекции кроликам галактозамин фосфат, тогда как у мышей наблюдается ответ на детерминанту фосфорилхоллин.

В других работах я рассмотрел гипотезу, что V-гены половых клеток селекционируются в процессе эволюции таким образом, что некоторые комбинации $V_L V_H$ кодируют специфичности, непосредственно важные для выживаемости животного и для его защиты против наиболее распространенных патогенов. Оптимальное число генов V_L и V_H в гаметях определяется равновесием между двумя противоположными селекционными воздействиями. Если число V-генов половых клеток слишком мало, то первоначальные темпы развития стимулируемого антигеном соматического разнообразия будут слишком медленными и животное в результате естественного отбора погибнет. Если дупликация генов превысит оптимальное число и будет много ненужных специфичностей или если накопление мутантов в избыточном фонде V-генов приведет к слишком малому числу клеток, в которых проявляются специфичности, имеющие непосредственное значение для выживания или если какие-то еще не появившиеся специальные механизмы станут необходимыми для регуляции проявления очень большого количества V-генов, то животное также окажется в неблагоприятных условиях в смысле естественного отбора.

Я полагаю, что в качестве рецепторов на В-клетках проявляется примерно 50 генов V_L и V_H половых клеток. Это число кодирует около 2500 специфичностей ($50V_L \times 50V_H$). Если допустить, что селекция данной специфичности может одновременно действовать только на одну комбинацию V_L, V_H , то мы получим один вид антител со специфичностью, непосредственно важной для выживания, и 2500 видов антител с посторонней активностью в результате случайных комбинаций 50 субъединиц. Эти 2500 видов антител в гаметях станут материалом для последовательной и ступенчатой селекции соматических мутаций. Общая потенция животного к эффективному ответу зависит от того, имеется ли антигенная селекция, и со временем потенция увеличивается. Степень ограничения ответа будет зависеть от того, сколько мутационных событий для каждой комбинации $V_L V_H$ требуется для появления данной специфичности. Именно поэтому неизбежно напрашивается мысль, что мутации структурных V-генов половых клеток должны определять специфический доминантный ответ. Однако соматическая селекция должна внести поправки в ответ, контролируемый генами половых клеток, и в конечном счете сильно и слабо отвечающие животные должны стать неразличимыми, так как у слабо отвечающих животных в процессе селекции идет отбор мутаций, влияющих на специфичность связывания.

Я вернусь к экспериментальной проверке этого позднее.

Б. Локус Ig— V_H^B проявляется на В-клетках

Ранее, на 3-й сессии, я привел пример комбинации гамет $V_L V_H$ с образованием специфичности, по моему мнению, необходимой для выживаемости животного, в которой структурный V-ген контролирует специфический доминантный ответ. У мышей генетический контроль первоначальной скорости ответа на детерминанту декстрина α -1,3-гликозил сцеплен с локусом тяжелой цепи, несущей маркер аллотипа. Сильно отвечающие животные, например, мыши BALB/c, продуцируют антитела к α -1,3-гликози-

ловой группе класса IgM с ограниченным идиотипом легкой цепи λ . Слабо отвечающие животные, например, мыши C57BL, продуцируют антитела IgM к α -1,3-гликозиловой группе другого идиотипа легкой цепи K. Поскольку идиотипический маркер зависит от первичной структуры антител, очевидно, он кодируется V-геном. Тот факт, что идиотип и начальная скорость ответа тесно связаны (их никогда не удавалось разделить), означает, что один и тот же ген определяет оба свойства. Гены V_H сцеплены с генами C_H , поэтому можно сделать вывод, что полиморфный структурный V-ген, отличающий сильно отвечающую мышь BALB/c от слабо отвечающей C57BL/6, является геном V_H . Иными словами, один из Ig-локусов кодирует тяжелую цепь. Я назвал бы этот локус Ig — V_H^B , так как этот локус иммунного ответа проявляется в B-клетках. Nisonoff, Kgause и я (сессия 3) рассматривали примеры идиотипа, детерминированного локусом тяжелой цепи. Понятно, что структура антител будет отчасти детерминироваться V_H^B . Главное в ответе на α -1,3 декстран в том, что как структура антител, так и степень ответа детерминируется V_H^B . При более детальном изучении, возможно, будут обнаружены другие примеры контроля ответа генами V_H^B , V_κ или V_λ , например, ответа на бараньи эритроциты у мышей Biozzi (3-я и 4-я сессии), ВТМ (Herzenberg, сессия 3), стрептококковые А- и С-углеводы (Kgause и Rajewsky, сессия 3).

Здесь я хочу подчеркнуть, что структурные V-гены половых клеток могут определять, будет ли животное сильно или слабо отвечающим. Как далеко ведет нас эта гипотеза? Все ли Ig-гены, контролирующие специфический доминантный ответ, являются структурными V-генами? Правильна ли моя формулировка проблемы, т. е. являются ли гены Ig генами V?

Известные структурные V-гены кодируют переменные участки тяжелой цепи (V_H^B) и двух легких цепей каппа (V_κ) и лямбда (V_λ), Лямбда является настолько малым компонентом иммуноглобулина у мышей (вид животных, который нас наиболее интересует), что, очевидно, в большинстве случаев, рассмотренных нами, играет роль не V_λ , а V_H^B , V_κ или какой-то другой V-ген.

Известны следующие Ig-локусы, контролирующие специфический доминантный ответ:

- 1) Ig— V_H^B , сцепленный с аллотипом тяжелой цепи;
- 2) локус Ig-1, находящийся между генами K и D в комплексе тканевой совместимости H-2;

3) один или несколько локусов Ig не сцепленных с аллотипом или H-2.

Вполне возможно существуют только 4 V-гена и лишь 4 Ig-локуса, контролирующих специфический доминантный ответ.

Для того чтобы было совершенно ясно, что я имею в виду, говоря о локусе Ig— V_L или Ig— V_H , я могу представить их как ряд V-генов, сцепленных с C-генами (раздел II, А). Я избегаю слова «цистрон», так как образование субъединицы иммуноглобулина требовало бы транслокации V-гена к C-гену, чтобы образовался цистрон VC. Пользуюсь термином Ig-локус в том же смысле, что Gally и Edelman пользуются термином «транслокон».

В. Локус Ig— V_H^T проявляется в t-клетках

Рассмотрим локус Ig-1. Согласно первой гипотезе Ig-1 кодирует каппа-цепь. Это допущение наиболее рационально и, по-видимому, упрощает всю проблему, поэтому нужно внимательно рассмотреть данные против него.

Существует один убедительный и один малоубедительный довод против этого допущения. Убедительный довод заключается в том, что у человека I_{pV} , $HL-A$ и $H-2$ гомологичны, то, очевидно, и у мыши ген V и $H-2$ не сцеплены. Для крысы, у которой не сцеплены локус каппа и главная система гистодокказательств (Rajewsky, сессия 3), этот довод менее убедителен, так как нет совместимости (Rajewsky, сессия 3), этот довод менее убедителен, так как нет доказательств, что и MHS гомологична $HL-A$ или $H-2$.

Более слабый довод основан на существовании генетического маркера, называемого пептидом I_B , который имеется у ряда подгрупп V_K (Edelman, Gottlieb. — «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 1970, v. 67, p. 1192). После анализа последовательности аминокислот мышинового V_K можно предположить, что продукт аллеля I_B^+ отличается от продукта аллеля I_B^- заменой аргинина на лизин в позиции 24.

Пептид I_B отсутствует у 18 линий мышей со многими различными аллелями $H-2$. Он имеется только у трех линий. Все они имеют $H-2^k$ (табл. 140).

ТАБЛИЦА 140

I_B -пептид у различных линий мышей
с аллелем $H-2^k$

Линия	I_B
AKR, C58, RFJ CBA, CE/J, C3H, C57Br	+ —

Убедительность или, наоборот, слабость довода, заключающегося в том, что локус каппа и комплекс $H-2$ не сцеплены, зависит от значения, которое можно придать двум указанным выше фактам.

Все линии I_B^+ имеют $H-2^k$.

Не все линии $H-2^k$ являются I_B^+ . Я считаю, что второй факт несколько более значим, так как линии C57Br и C58 происходят от скрещивания между одним и тем же самцом 52 и самками 57 и 58. Все три животных принадлежат к одному помёту (Potter and Lieberman. — «Adv. Immunol.», 1967, v. 7, p. 134). Линии C57Br и C58 имеют $H-2^k$, но C57Br, вероятно, I_B -отрицательна, а C58 I_B -положительна. Поэтому весьма вероятно, что локус I_B и комплекс $H-2$ не сцеплены. Однако без специально поставленного скрещивания это доказательство слабое. Вопрос настолько важен, что мы должны получить ответ, основанный на формальной генетике I_B и $H-2$.

Допустим, что локус каппа и $H-2$ сцеплены. Исходя из теоретических соображений, я покажу, как можно было бы объяснять имеющиеся результаты, если бы I_g-1 кодировал каппа-цепь. Допущение, что I_g-1 не является локусом каппа, позволит мне предположить, что может кодироваться локусом I_g-1 другой продукт, и рассмотреть глубокие различия по проявлению ответа.

Если I_g-1 кодирует субъединицу каппа, то следующим этапом будет картирование локуса каппа при помощи структурных маркеров и маркеров иммунного ответа. Необходимо продолжить поиски сцепления между маркером I_B и локусами I_g , не сцепленными с $H-2$ или с аллотипом тяжелой цепи. Безусловно, мы можем ожидать иммунный ответ, детерминированный

генами V_{λ} . Я обозначу проявление этого ответа гипотетическим локусом иммунного ответа $Ig-V_{\lambda}$ и для полноты хочу предположить, что существует локус $Ig-V_{\lambda}$.

Затем я буду рассматривать преимущественно локус $Ig-1$. Мы должны попытаться понять, почему этот локус имеет значение в большинстве случаев специфического доминантного ответа. С этой целью нужно сначала проанализировать механизмы регуляции ответа продуктом $Ig-1$.

Второе положение в моем перечне (раздел II) заключается в том, что $Ig-1$ кодирует новую субъединицу иммуноглобулина. Очевидно, эта субъединица должна быть тяжелой цепью, проявляющейся исключительно в t -клетках. Этот второй локус тяжелой цепи, очевидно, должен иметь такое же строение, как известный локус тяжелой цепи, меченной аллотипом, т. е. ряд V -генов, сцепленных с C -геном.

Говоря об этой гипотезе, я обозначу локус $Ig-1$ как $Ig - V_H^T$ в отличие от известного локуса $Ig - V_H^B$. Поскольку $Ig-1$ контролирует специфический доминантный ответ, определяемый по сывороточным антителам, и поскольку сывороточные антитела у мышей кодируются известными локусами легких цепей и меченных аллотипом тяжелых цепей, напрашивается вывод, что $Ig-1$, который не кодирует ни каппа-цепи, ни тяжелые цепи, не проявляется как рецептор B -клеток. Нам известен только еще один возможный способ генетического детерминирования специфического доминантного ответа, а именно через кооперирующие t -клетки. Это означает, что $Ig-1$ кодирует субъединицу, которая детерминирует специфичность ассоциативного рецептора на кооперирующей t -клетке. Таким образом, можно обосновать мои условные обозначения $Ig - V_H^T$ для сцепленного с $H-2$ локуса $Ig-1$, проявляющегося в t -клетках, и $Ig - V_H^B$ для локуса, сцепленного с аллотипом и проявляющегося в B -клетках. Гипотетические локусы $Ig - V_{\lambda}$ и $Ig - V_{\mu}$ должны проявляться как в t -, так и в B -клетках.

Я отдаю себе отчет, что на этой конференции мы пришли к выводу, что B - и t -клетки несут рецепторы, состоящие из различных V -областей или полипептидных цепей, так как специфичность сывороточных антител, по видимому, отлична от специфичности кооперативной или опосредованной клетками активности (Benacerraf, сессия 1; Katz, Benacerraf. — «Adv. Immunol.», 1972, v. 15, p. 2). К несчастью, к этому выводу нельзя прийти на основании проведенных до настоящего времени исследований специфичности. Для их интерпретации требуется более общая система отсчета, поэтому я возвращусь к ним (разделы V, А и V, Б), когда буду говорить об асимметрии соотношения t - и B -клеток и о том, в какой степени можно рассматривать клеточный иммунитет как функцию t - или B -клеток. Во всяком случае, кроме упомянутых выше генетических доводов, других доказательств о том, что $Ig-1$ не является локусом каппа, нет (раздел II, Б).

III. МОДЕЛЬ ПРОЯВЛЕНИЯ Ig -ГЕНА В АССОЦИАТИВНОМ РАСПОЗНАВАНИИ

Я подчеркиваю, что единственной известной достоверной пробой на функцию антигенчувствительной клетки тимусного происхождения (t -клетки) является кооперативная активность. Как я замечу далее, пробы на индуцированную клеточную активность не являются более прямым и легче интерпретируемым определением кодируемого $Ig-1$ рецептора t -клеток, чем пробы на индуцированные сыворотки антитела. Рассмотрю физиологию ответа на антигены, чтобы получить общий фон для обсуждения, во-первых,

причин, по которым было предложено здесь несколько гипотез о химическом характере кодируемого Ig-1 рецептора, проявляющегося в клетках тимусного происхождения, во-вторых, ожидаемого и наблюдаемого поведения аллелей высокого и низкого уровня ответа всех Ig-локусов.

Для этого я хочу точно сформулировать три допущения, обоснованные в ряде работ:

— Каждая антигенчувствительная клетка (B или t, см. рис. 83 и 84) синтезирует и проявляет особый рецептор, идентичный по специфичности антителам, которые эта клетка вырабатывает после стимуляции: в принципе минимальное требование к осуществлению аллельного исключения состоит в том, что клетка становится монопотентной после индукции (см. примечание 8 в работе Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 529; Cohn. — «Cell Immunol.», 1972, v. 5, p. 1).

— Каждая антигенчувствительная клетка (B и t) может быть парализована или активирована.

— Постоянно образуются антигенчувствительные клетки со специфичностью против «своего» и против «чужого».

Логика этой системы ведет нас к модели распознавания своего и чужого, принципы которой (недетальный механизм) восходят к I симпозиуму в Brook Lodge по иммунологической толерантности, Bretscher и я подробно обсудили эти принципы в ряде работ (Bretscher, Cohn. — «Nature», 1968, v. 220, p. 444; Cohn. — «Control processes in Multicellular organisms». Churchill. London, 1970; Bretscher, Cohn. — «Science», 1970, v. 169, p. 1042; Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 529; Cohn. — «Cell Immunol.», 1972, v. 5, p. 1; Bretscher. — «Transplantation Rev.», 1972, v. 11, p. 218; Bretscher. — «Cell. Immunol.», 1973, v. 6, p. 1).

Основные указания на ассоциативную модель распознавания (рис. 81) таковы:

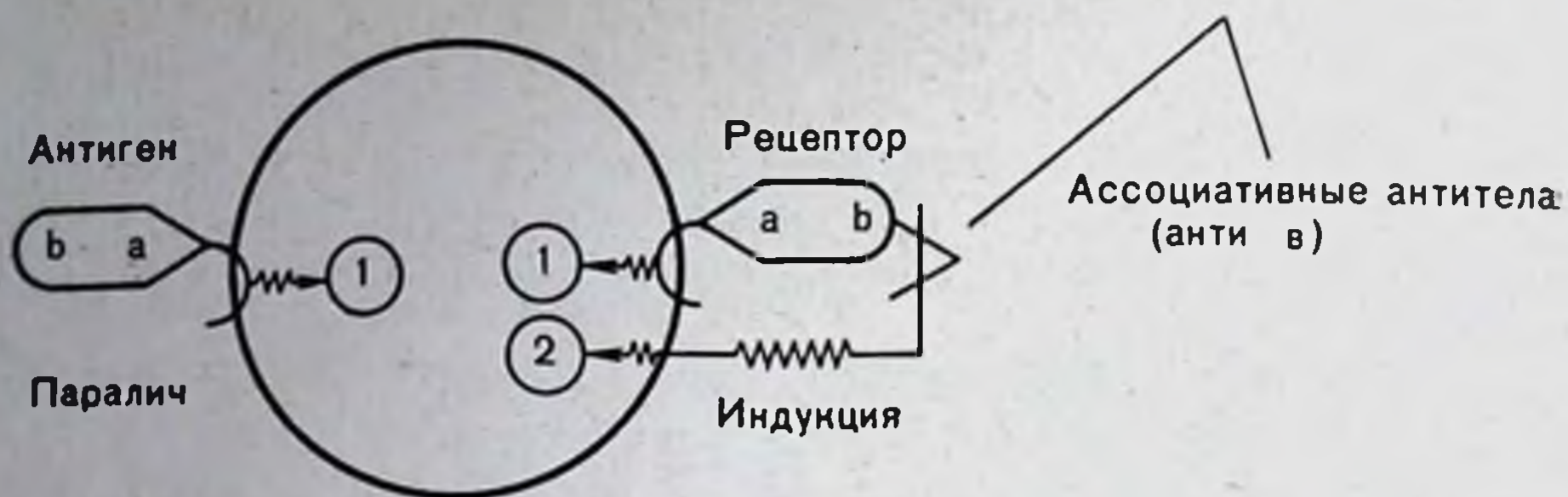
— Паралитическое взаимодействие заключается в связывании антигена с рецептором антигенчувствительной клетки, в результате чего эта клетка получает сигнал 1.

— При нормальном индуктивном взаимодействии обязательно требуется распознавание минимум двух детерминант на антигене: одна детерминанта распознается рецептором на антигенчувствительной клетке, а другая — ассоциативными антителами, через посредство которых клетка получает другой сигнал 2; т. е. сигналы $1 + 2 =$ индукционному сигналу. Мы называем это ассоциативным распознаванием. Термин «ассоциативные антитела» был введен для того, чтобы избавиться от путаницы, порожденной термином «антитела к носителю», который мы ввели раньше и за который нас так строго порицал Sela 4 года назад на конференции в Brook Lodge по иммунологической толерантности.

Эта минимальная модель имеет три важных элемента:

— Паралитический сигнал 1 включен в индукционный сигнал $1 + 2$. Это означает, что ни одна клетка не может быть активирована, если эта клетка не может быть парализована.

— Паралитический сигнал 1 возникает через рецептор на антигенчувствительной клетке вследствие изменений конформации при взаимодействии с антигеном. Сигнал 2 возникает через ассоциативные антитела к антигену чувствительной клетке вследствие распознавания этой клеткой антигена ассоциативными антителами. Сигнал 2 сам по себе не идентичен химически с ассоциативными антителами. Я пытаюсь внести ясность в неправильное представление о нашей модели, недавно высказанное несколькими группами авторов, например: Dutton e.a. — «Progress in Immunol.», Academic Press. N. Y., 1971, v. 1, p. 355;



Антиген чувствительная клетка (анти-а), способная как к индукции, так и к параличу

- ① Сигнал через рецепторные антитела
- ② Сигнал через ассоциативные антитела

Рис. 81. Модель минимального ассоциативного распознавания, нормальной индукции и паралича.

Feldman. — «J. Exp. Med.», 1971, v. 136, p. 737; Anderson, Sjöberg, Möl-
ler. — «Transplant. Rev.», 1972, v. 11, p. 131. Браун на 1-й сессии выска-
зал несколько интересных мыслей о том, чем, возможно, являются сигналы.

— По всей вероятности, нормальный индукционный сигнал передается рецептором и ассоциативным антителом, сцепленными вместе антигенным мостиком для того, чтобы сигнал 2 был ограничен антигенчувствительной клеткой в процессе ассоциативного распознавания через сигнал 1. Если бы два сигнала не распознавались ассоциативно, то были бы индуцированы антигенчувствительные клетки к собственным компонентам. Эта теория дает нам возможность предсказать существование аномального индукционного сигнала, при котором сигнал 1 тот же, что и при нормальной индукции, т. е. основан на взаимодействии рецептора с антигеном, но сигнал 2 дается через распознавание ассоциативными антителами поверхностной детерминанты на антигенчувствительной клетке, а не самого антигена. Этой поверхностной детерминантой мог бы быть вирус, гаптен, бактериальный липополисахарид, антиген гистосовместимости и т. д. (раздел VI).

А. t-клетки регулируют только возникновение индукции или паралича

Роль ассоциативных антител заключается в регуляции распознавания «своего» и «чужого».

Позднее (раздел VI, Е) я вернусь к данной проблеме, когда будут говорить об аллофенных тетрапарентальных мышах.

Решение о том, является ли антиген «своим» (С) или «чужеродным» (Ч), зависит от «иммунологической памяти» животного по отношению к этому антигену. Например, если бы «свой» антиген присутствовал в то время, когда в процессе онтогенеза образовалась иммунная система, и продолжал постоянно присутствовать, то у животного поддерживалась бы толерантность к нему. Антиген, который не присутствует постоянно, а появляется поздно, например, когда животное достигает взрослого возраста, распознается как чужеродный.

Модель ассоциативного распознавания может объяснить распознавание «своего» и «чужого» следующим образом:

В процессе онтогенеза должны быть оптимально детерминированы как скорость появления иммунной системы, так и сроки. Образующиеся антигенчувствительные клетки против С парализуются взаимодействием с соб-

ственными компонентами, так как уровень ассоциативных антител против С слишком низкий. Вероятность того, что в организме будет достаточно большое количество t-клеток против С, в данный момент очень мала. Антигенчувствительные t- и В-клетки против Ч накапливаются в отсутствие чужеродного антигена Ч. Пока С присутствует постоянно, животное поддерживает толерантность, так как взаимодействие рецептора с антигеном при недостатке ассоциативных антител ведет к параличу антигенчувствительных клеток против С. Если уровень ассоциативных антител достаточно высокий, например у взрослого животного, сталкивающегося с чужеродным антигеном, то возникновение толерантности (экспериментальный паралич), а также индукция ответа имеют особые свойства по сравнению с поддержанием толерантности. Поддержание толерантности не зависит, а возникновение толерантности зависит от концентрации антигенов (феномен Mitchison). Это свойство можно предсказать по модели.

Подчеркиваю, что я не рассматриваю ассоциативные антитела как добавочное «хелперное» устройство, наслонившееся на «истинный» и пока еще неизвестный механизм распознавания «своего» и «чужого». Обычно принято считать, что t-клетка «помогает», но не играет основной роли в выборе между индукцией ответа и паралича, это мнение должно быть пристально изучено, так как оно объясняет, почему пока не появилось конкурирующих моделей распознавания «своего» и «чужого» (противоположные взгляды рассматриваются в работах: Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1970, v. 190, p. 529; Cohn. — «Cell. Immunol.», 1972, v. 5, p. 1; Bretscher. — «Transplant. Rev.», 1972, v. 11, p. 218). Я считаю, что модель ассоциативного распознавания относится ко всем антигенам, так называемым тимусзависимым и тимуснезависимым, и ко всем индуцируемым и парализуемым иммунным ответам («гуморальным» или «клеточным»). Далее, для того чтобы толерантность к самому себе была стабильной, надо допустить, что и t- и В-клетки подвержены параличу (Bretscher, Cohn. — «Science», 1970, v. 169, p. 1042). Меня удивляет, что Miller (1-я лекция имени Бернета в Австралийской академии наук, 1972, v. 2, p. 2) пришел к следующему выводу (цитирую): «Действительно, может оказаться, что толерантность к собственным компонентам — свойство, принадлежащее исключительно популяции t-клеток, а толерантность В-клеток является просто лабораторным артефактом». Интересно, о какой теории распознавания «своего» и «чужого» думал Miller, когда пришел к этому заключению.

Здесь я хотел бы сделать довольно широкое обобщение, а именно, что единственной ролью ассоциативных антител является регуляция распознавания «своего» и «чужого». Согласно модели, ассоциативные антитела могут вырабатываться любой популяцией клеток, хотя, вероятно, эта популяция будет иной, чем популяция, вырабатывающая эффекторные антитела. Далее ассоциативные антитела, очевидно, могут действовать в свободном виде или, будучи связаны с монопотентной клеткой, которая их вырабатывает, либо с какой-то другой клеткой, по типу цитофильных антител. Однако по многим соображениям мы остановились на мнении, что:

- ассоциативные антитела имеют тимусное происхождение;
- они действуют как цитофильные антитела на других клетках;
- они имеют небольшую продолжительность жизни по сравнению с другими классами иммуноглобулинов в отсутствие антигенчувствительных клеток, вырабатывающих их; таким образом, аутоиммунные явления сводятся к минимуму.

Следовательно, ассоциативные антитела, очевидно, являются особым белком, отличающимся от известных классов иммуноглобулинов (рис. 82).

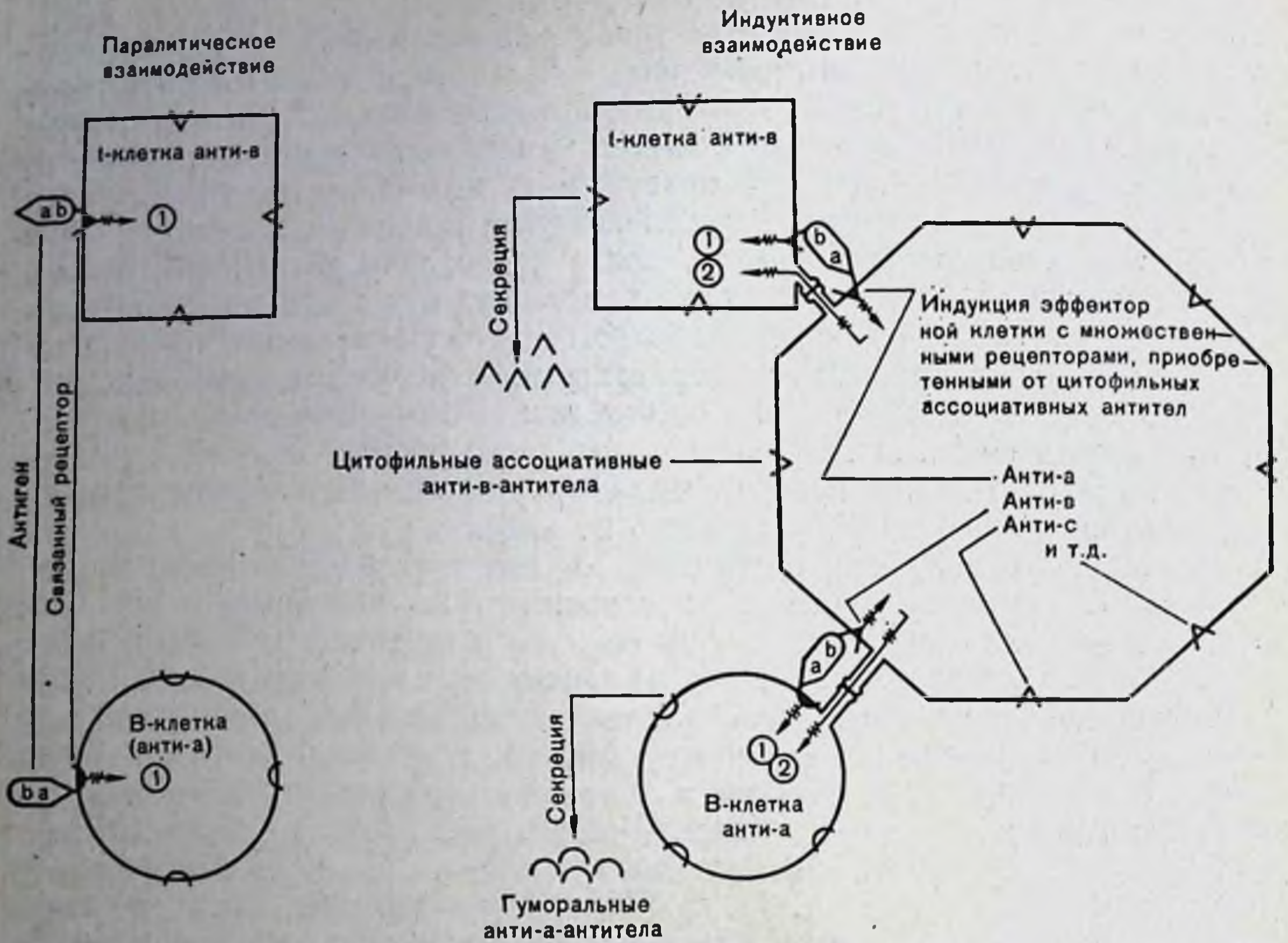


Рис. 82. Точная (неминимальная) модель ассоциативного распознавания нормальной индукции и паралича.

Если мы имеем дело с взаимодействием между двумя антигенчувствительными клетками В и t, то В-клетка должна индуцироваться сигналом 2, исходящим от t-клетки, но t-клетка должна быть парализована, так как В-клетка не может посылать сигнал 2. В их соотношениях наблюдается асимметрия. Есть несколько решений, позволяющих избежать этого противоречия, например, t-клетка после индукции может стать моноспецифической эффекторной клеткой (которая не индуцируется и не парализуется). Однако я предпочитаю предположить, что эта клетка секретирует ассоциативные антитела, действующие цитотропно на другую клетку-эффектор (см. рис. 82).

Прежде всего это предположение означает, что эффекторная функция никогда не может выполняться самой антигенчувствительной клеткой, а всегда секретированными антителами, которые в некоторых случаях действуют как цитотропные рецепторы для другой эффекторной клетки. Единственный случай, к которому это обобщение не подошло бы, это так называемый клеточный иммунитет. Большинство исследователей, работающих в этой области, предполагают, что киллерной, или эффекторной, клеткой является сама антигенчувствительная t-клетка тимусного происхождения, которая прямо взаимодействует с антигеном-мишенью. Согласно теории ассоциативного распознавания (рис. 82 и 83), такое взаимодействие привело бы к параличу антигенчувствительной клетки. Следовательно, индукции клеточного ответа противодействовал бы паралич системы, когда функционирует ее эффекторный механизм. Это не представляется рациональным, следовательно, было предложено допущение, что «клеточные» антитела

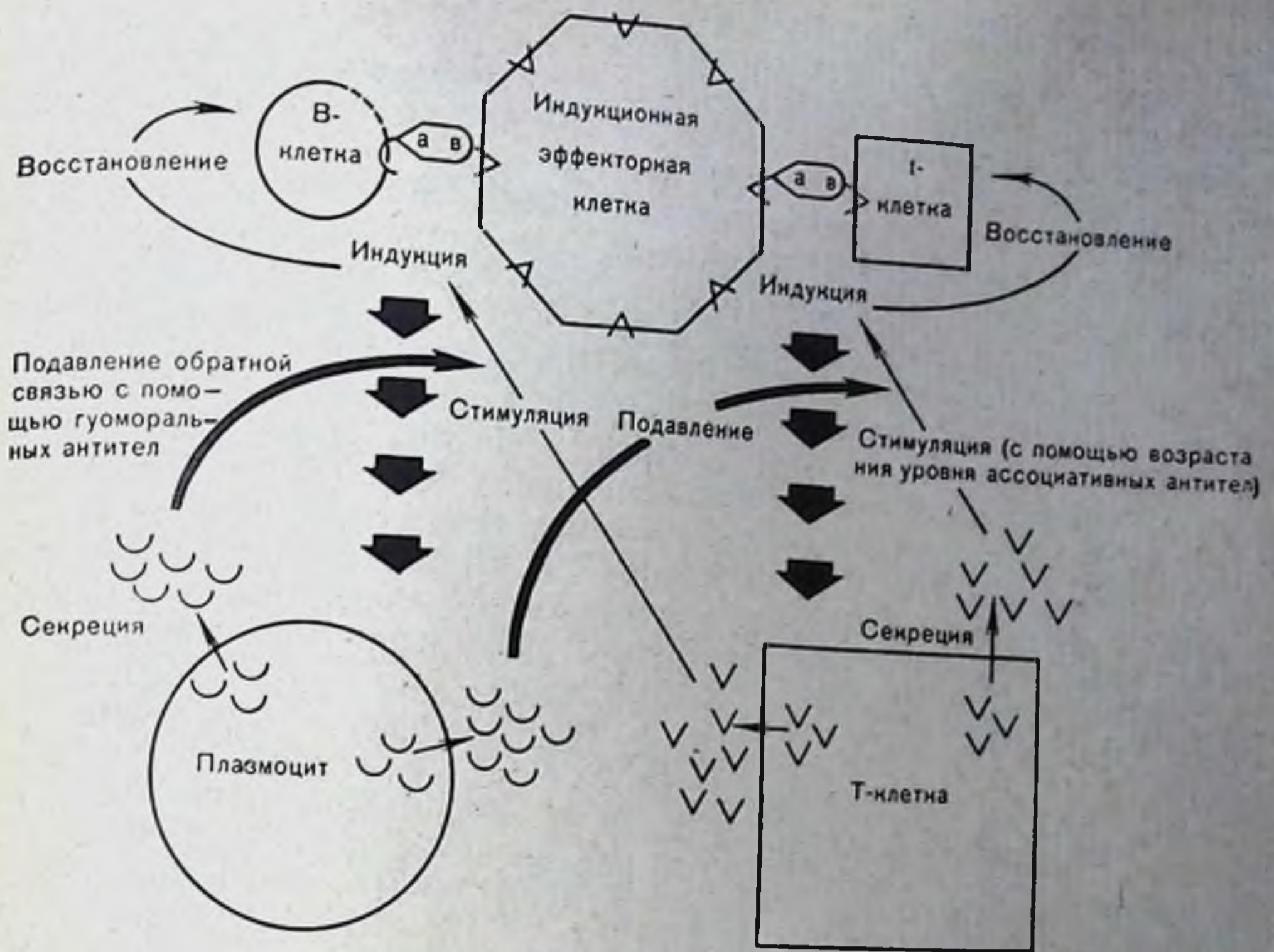


Рис. 83. Асимметрия связей между В- и t-клетками.

действуют цитофильно (более подробное обсуждение см.: Cohn. — «Immune Surveillance, Academic Press. N. Y., 1970, p. 377—379; Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 529; Cohn. — «Cell. Immunol.», 1972, v. 5, p. 1).

Б. В-клетки являются медиаторами всех эффекторных функций

Уже упомянутое мною обобщение имеет и вторую часть, а именно, что ассоциативные антитела должны принадлежать к особому классу, отличающемуся от всех эффекторных антител (включая опосредованные клетками). Поскольку функция ассоциативных антител заключается в регулировании распознавания «своего» и «чужого», уровень их должен быть минимальным, чтобы избежать аутоиммунных явлений (из-за контакта с антигенами, дающими перекрестные реакции со «своим»), тогда как уровень эффекторных антител должен быть максимальным, чтобы оптимально справиться с патогенами. Это требование независимой регуляции позволяет думать, что клетки, продуцирующие ассоциативные антитела, и клетки, продуцирующие эффекторные антитела, должны принадлежать к разным популяциям. Онтогенез этих популяций, одной популяции медиатора ассоциативного распознавания и другой популяции, выполняющей эффекторные функции, не имеет решающего значения для теории. Однако по аналогии со всеми другими эффекторными антителами можно было бы предположить смелую гипотезу, что единственная роль t-клеток заключается в ассоциативном распознавании, опосредованном ассоциативными антителами (которые отчасти кодируются $I\gamma - V_H^T$), а единственная роль В-клеток заключается

в эффекторной функции, опосредованной через различные классы иммуноглобулинов (которые отчасти кодируются $Ig - V_H^B$). Иными словами, при клеточном иммунитете t-клетка должна быть решающим элементом при выборе между индукцией и параличом, но не играет роли в проявлении уже индуцированной эффекторной функции.

Существуют три экспериментальных довода, которые поддерживают это объяснение. Антитела, обнаруженные в сыворотке, покрывают клетки-мишени (эритроциты, фибробласты, опухолевые клетки и т. д.) и активируют интактные селезеночные клетки (эффекторы) к распознаванию мишени и выполнению цитотоксической реакции, определяемой по выделению хрома (Moller. — In: *Immune Surveillance*, Academic Press, New York, 1970, p. 96—101; McLennan, Loewi, Harding. — «*Immunology*», 1970, v. 18, p. 397; Perlmann, Perlmann. — «*Cell. Immunol.*», 1970, v. 1, p. 300). Далее известно, что В-клетки донорского происхождения участвуют в спленомегалии в РТПХ (Cerottini, Nardin, Brunner. — «*J. Exp. Med.*», 1971, v. 134, p. 553). Эти опыты позволяют предположить, что какой-то класс сывороточных антител может активировать эффекторные клетки. Предполагается, что «киллерная» эффекторная клетка является макрофагом (Evans, Alexander. — «*Nature*», 1972, v. 236, p. 168; Lowmann-Mattes, Schipper, Fischer, Eugo. — «*J. Immunol.*», 1972, v. 2, p. 45; Dennert, Lennox. — «*Nature*», 1972, v. 238, p. 114). Есть также доводы против этого мнения (Wagner, Feldmann, Boyle, Schrage. — «*J. Exp. Med.*», 1972, v. 136, p. 33). Антисыворотка против идиотипа, направленная против данной сывороточной специфичности анти-Н-2, блокирует СКЛ (Ramseier, Lindenmann. — «*Eur. J. Immunol.*», 1972, v. 2, p. 109). Согласно этому опыту, сывороточные антитела анти-Н-2 имеют тот же идиотип, что и эффекторные антитела в СКЛ. Строго говоря, ни один из этих экспериментов не исключает тимусного происхождения особого класса сывороточных антител. Однако они показывают, что некоторые так называемые клеточные иммунные реакции выполняются цитотоксическими сывороточными антителами. Хорошо абсорбируемая, следовательно, высокоспецифическая анти- θ -сыворотка не блокирует клеточные эффекторные функции, определяемые при помощи пробы на цитотоксическое выделение хрома (Dennert, Lennox. — «*Nature*», 1972, v. 238, p. 114).

Далее популяцию t-клеток можно активировать до высокой кооперативной активности и вместе с тем цитотоксическая активность не будет наблюдаться (Dennert, Tucker. — «*J. Exp. Med.*», 1972, v. 136, p. 656). Эти опыты не только позволяют разделить ассоциативное распознавание и опосредованную клетками активность, но и вызывают большое сомнение в эффекторной функции t-клеток при клеточном иммунитете.

Для того чтобы на основании этих опытов точно утверждать, что клеточный иммунитет является эффекторной функцией В-клеток, необходимо идентифицировать класс иммуноглобулинов и прямо доказать, что он является продуктом В-клеток.

Я обратился к анализу этого вопроса и довел свои доводы до крайностей, так как для изучения продукта Ig-1 сейчас применяются опосредованные клетками пробы. Я не сомневаюсь в том, что локус Ig-1 проявляется как рецептор t-клеток, участвующий в ассоциативном распознавании всех индуцируемых и парализуемых иммунологических функций (включая «опосредованные клетками»). Сомневаюсь в том, что t-клетки, распознающие антиген через рецептор, закодированный Ig-1 (ассоциативные антитела), ответственны за опосредованную клетками эффекторную функцию. При любом тесте клеточной активности необходимо различать, определяется ли индук-

ция (функция t-клеток) или эффекторная активность (возможно, функция В-клеток). Таким образом, в принципе тесты на индукцию клеточной активности являются не более прямыми определениями функций ассоциативного распознавания t-клеток, опосредованной через рецептор, закодированный Ig-1, чем тесты на индукцию сывороточных антител.

В. Замечания о функции t- и В-клеток

Прежде чем обсудить проблему ассоциативных антител, надо сделать несколько замечаний в связи с постулатом о том, что популяция t-клеток ответственна исключительно за распознавание «своего» и «чужого», опосредованное ассоциативными антителами, тогда как популяция В-клеток ответственна только за эффекторные антитела, медиаторы всех защитных или предохранительных функций иммунной системы.

1. t-КЛЕТКА НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТОРНОЙ КЛЕТКОЙ

Благодаря воображению редакторов Smith и Landy на обложке «Immune Surveillance», изданного Academic Press в Нью-Йорке в 1970 г., показана модель эффекторной фазы клеточного иммунитета, предложенная Möller. Если мне будет разрешено изложить суть его мысли, то я скажу, что определенный класс антител, вырабатываемый В-клетками, может цитотоксично взаимодействовать с t-клетками и придавать им способность функционировать в качестве цитотоксических эффекторных клеток.

Я уже говорил, что, согласно Möller, сывороточные антитела могут вооружать эффекторные клетки в лимфоидных тканях так, что они становятся цитотоксичными для клетки-мишени. По модели Möller эффекторное звено опосредованного клетками умерщвления является функцией В-клеток (см. обсуждение у Sohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 529). По этой модели Т-клетка является эффекторной клеткой, получившей свои рецепторы от цитотоксических эффекторных антител, вырабатываемых В-клетками. Это сразу же ставит перед нами основной вопрос о том, являются ли Т-клетки вообще клетками, чувствительными к антигену, т. е. имеют ли они рецепторы, которые сами синтезируют. Единственное требование модели ассоциативного распознавания заключается в том, что ассоциативные и эффекторные антитела должны синтезироваться разными популяциями клеток. Следовательно, необходимо доказательство того, что t-клетки являются не просто эффекторными, а скорее антигенчувствительными клетками, проявляющими свои собственные синтезированные рецепторы, тем более что мы подходим к спорному вопросу о химическом характере рецептора t-клеток.

Лучшее доказательство состоит в том, что t-клетки могут специфически парализоваться. Следовательно, даже если бы они были также пассивно вооружены «киллерными» клетками, они являются антигенчувствительными клетками, проявляющими ограниченное число рецепторов (вероятно, один), т. е. проявление специфичности имеет клональное распределение (раздел V, Б).

Существуют и другие, довольно убедительные прямые данные. Они получены в опытах, показавших:

- 1) специфическое, зависимое от антигена «самоубийство» кооперативной функции (Basten, Miller, Wagner, Puc. — «Nature», 1971, v. 231, p. 104);
- 2) индукцию кооперативной, но не эффекторной активности во взвеси тимусных клеток, перенесенных облученным реципиентам (очевидно, лишен-

ным функции В-клеток) (Denpert, Tucker. — «J. Exp. Med.», 1972, v. 136, p. 656); 3) «прилипающая клетка» (которая в литературе не точно называется макрофагом), а не t-клетка является «киллерной» эффекторной клеткой.

Таким образом, я допускаю, что t-клетки являются только антигенчувствительными клетками, проявляющими ассоциативные антитела, существование которых предполагается моделью ассоциативного распознавания.

Мои рассуждения ведут к твердому выводу, что t-клетка как таковая (антигенчувствительная клетка, функционирующая при ассоциативном распознавании) не является эффекторной клеткой, функционирующей при клеточном иммунитете. Этот факт не вызывает у меня сомнений. Я меньше уверен в предположении, что эффекторная клетка может быть еще одной популяцией антигенчувствительных клеток тимусного происхождения, которая после индукции дифференцируется и становится эффекторной клеткой, не способной к индукции и к параличу. Если бы эта клетка была «киллерной» эффекторной клеткой, то ее рецептор мог бы принадлежать к любому классу иммуноглобулинов. Если эта «конечная клетка» секретирует цитотоксические антитела, которые вооружают «киллерные» эффекторные клетки, то следовало бы предположить класс иммуноглобулина с совершенно особым константным участком тяжелой цепи. Этот новый класс тяжелых цепей мог бы кодироваться локусами, сцепленными с тканевой совместимостью или с аллотипом (или другими локусами). На основании имеющихся фактов я делаю вывод, что клеточная иммунная активность, является эффекторной функцией, происходящей от В-клеток.

Я не уверен в том, какова морфология «киллерной» эффекторной клетки. Предполагается, что два типа эффекторных клеток входят в «прилипающую популяцию». Индукционную эффекторную клетку постоянно называют макрофагом. Возможно, что фагоцитарный распад некоторых антигенов, например бараньих эритроцитов, на иммуногенные фрагменты, усиливает ответ, но этот распад является следствием самого механизма индукции. Действительно, мы не должны допускать, что индукционные, или «киллерные», эффекторные клетки действуют в качестве первичного механизма через фагоцитарную активность. Кандидатами на роль индукционных клеток являются ретикулярные или дендритные клетки, а на роль «киллерных» клеток — макрофаги или клетки, подобные лимфоцитам. Я хочу напомнить вам, что «киллерная» эффекторная клетка может выделять многие фармакологически активные медиаторы и цитотоксические агенты, за выработку которых принято считать ответственными сами t-клетки.

2. ИММУНОПАРАЛИЧ ВЫЗЫВАЕТСЯ ИНАКТИВАЦИЕЙ АНТИГЕНЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

При обсуждении роли t-клетки перед нами возникает весьма коварная и показательная проблема методики. Мы пытаемся понять регуляторный механизм распознавания «своего» и «чужого». В лаборатории мы изучаем индукцию и паралич и принимаем на веру, что эксперименты по изучению генетических и негенетических факторов, регулирующих ответ на исследуемые антигены, дадут нам возможность по аналогии заключить, как происходит распознавание «своего» и «чужого». Примером такого экстраполирования является модель ассоциативного распознавания. Паралич — явление «негативное». В рабочем понимании этого термина паралич — это специфическое ареактивное состояние, вызванное предварительным контактом с антигеном. Паралич выявляется попыткой индукции ответа. Специфическая ареактивность, вызванная инактивацией антигенчувствительных кле-

ток, может иметь два механизма: один, действующий косвенно, через индуцированные эффекторными антителами, а другой, как показано на рис. 82 и 83, прямо через рецептор на антигенчувствительной клетке. Я утверждал, что ассоциативные антитела не могут функционировать в норме как какне-мента или цитотоксины. Неполные конкурирующие модели, предложенные Azag и Good («J. Immunol.», 1971, v. 106, p. 241; Kreth, Williamson. — «Nature», 1971, v. 234, p. 454). Azag и Good постулируют, что паралич опосредован лизисом с участием комплемента. Это означает, что индукция синтеза антител должна предшествовать параличу и привести к образованию связывающего комплемента комплекса антиген—антитело на поверхности специфического лимфоцита, распознающего детерминанту этого антигена через свой рецептор. t-Клетка не может играть основной роли при вы-боре между индукцией и параличом, если не допустить, что происходящие от t-клеток ассоциативные антитела являются единственным классом анти-тел, опосредующим предполагаемый лизис с участием комплемента. Kreth и Williamson, следуя за Mitchison в книге «Mediators of Cellular Immunity». Academic Press. N. Y., 1969, p. 77, приписывает каждой t-клетке две функции: ассоциативное распознавание и эффекторную фазу клеточного иммунитета, которые осуществляются через рецептор t-клеток.

Одним из лучших способов проверить такие гипотезы будет попытка до-вести аргументацию до конца. Предположим, что ассоциативные антитела, закодированные Ig-1 и происходящие от t-клеток, выполняют «киллерную» функцию вместе с комплементом или эффекторной клеткой и функцию ассо-циативного распознавания. При иммунном ответе любая антигенчувствитель-ная клетка t или B после взаимодействия с антигеном должна активировать-ся, если она входит в контакт с ассоциативными антителами на поверхности индукционной клетки, или лизироваться, если она входит в контакт с теми же ассоциативными антителами на поверхности эффекторной клетки. Нор-мальная индукция должна привести не к возникновению иммунологической памяти, а к необратимому иммунопараличу, так как эффекторная функция должна превалировать над функцией ассоциативного распознавания в кон-куренции между индукцией и лизисом. Регуляция синтеза эффекторных и ассоциативных антител входит в нормальный индукционный механизм борь-бы с патогенами (раздел III, Б). Гипотезы, ставящие знак равенства между функциями ассоциативного распознавания и эффекторными функциями, неудовлетворительны, и этот вопрос не сводится к тому, верны они или нет. Дело в том, что они не позволяют нам проникнуть в механизм иммунного ответа, а просто повторяют уже известные факты. Не предпринимается по-пытки проанализировать, каким образом гипотеза допускает индукцию и параличи и распознавание «своего» и «чужого». Например, нам не объясня-ют, каким образом t-клетка, взаимодействующая с антигенчувствительной клеткой (через связанный антиген или детерминанту клеточной мембраны), получает сигнал к индукции или к лизису. Действительно, вопрос о том, как индуцируется клеточный иммунитет, остается в тени. Если бы, исходя из своей гипотезы, Kreth и Williamson могли ответить, как происходит выбор между «индукцией и параличом», то может быть они не пришли бы к выводу, что «умерщвление» (опосредованное клетками) и «стимуляция» (ин-дукция) являются двумя проявлениями одного и того же основного про-цесса. (Слова, вставленные в скобках, мои.) [Я настаиваю на основном по-ложении, что при выдвижении таких гипотез необходимо обратиться к во-просу о выборе между индукцией и параличом по причинам, изложенным в моей статье (Cohn. — «Cell. Immunol.», 1972, v. 5, p. 1)].

Подчеркиваю, что ассоциативная и эффекторная функции нуждаются в самостоятельной регуляции. Следовательно, они опосредованы разными молекулами, которые вырабатываются разными клетками. Таким образом, по моему мнению, паралич — это центральный механизм инактивации клеток, имеющий место независимо от индукции эффекторных антител и осуществляемый через взаимодействие антигена с рецептором. Это — ключ к распознаванию «своего» и «чужого», т. е. суть модели ассоциативного распознавания. Однако часто бывает трудно интерпретировать результаты опытов, так как в эксперименте могут сложиться аномальные ситуации, в которых эффекторные антитела через лизис с участием комплемента или ЦЭЛ могут инактивировать антигенчувствительные клетки, связавшие антиген, который распознается как чужеродная поверхностная детерминанта. Это ведет к специфическому подавлению гуморального ответа, вероятным примером чего являются так называемые «супрессорные Т-клетки», по поводу которых сейчас столько шума. Я не буду объяснять, что произойдет с трактовкой этого феномена, если окажется, что опосредованный клетками цитотоксический эффект является функцией В-клеток. Вместо этого я предложил бы тем, кто высказывает неясные, но заманчивые мысли о том, что контролируемая индукция «супрессорных Т-клеток» и «индуцирующих Т-клеток» обеспечивает центральный регуляторный механизм для распознавания «своего» и «несвоего» (Allison. — «Lancet», 1971, v. 2, p. 1401; Allison, Denman, Barnes. — «Lancet», 1971, v. 2, p. 135; Kutz, Venesgraf. — «Adv. Immunol.», 1972, v. 15, p. 2), представить нам исчерпывающую компетентную общую теорию, а не повторение фактов. Моя позиция стала еще более твердой, когда Jerne (Ontogeny of Acquired Immunity, Elsevier, North Holland, 1972, p. 5—7) подчеркнул особую роль этих супрессорных эффектов как главных в нормальном механизме регуляции «индукции ответа и толерантности», но не смог сказать нам, как их разделить. Я чувствую, что все указанные супрессорные феномены являются вторичными, и беру на себя смелость предположить, что основной ролью t-клеток является ассоциативное распознавание и что локус Ig-1 кодирует только ассоциативные антитела.

Добавим, что существует один феномен, который можно было бы назвать «специфической толерантностью», но который не вызывает инактивации, а, наоборот, индуцирует антигенчувствительные клетки. «Толерантность» тестируют выживанием трансплантата. Выживание зависит от продукции так называемых протективных, или усиливающих, антител, блокирующих опосредованный клетками механизм отторжения. Это другой пример феномена толерантности опосредованного эффекторными антителами, и по причинам, указанным выше, я не буду обсуждать данную проблему. Хотя эти эффекторные механизмы очень важны и практически, и теоретически (Immunological Intervention. Acad. Press. N. Y., 1971), они имеют вторичное значение для понимания проявления локусов (см. раздел VI, E).

3. СУДЬБА Т- И В-КЛЕТОК У МЫШЕЙ BIOZZI

Мне особенно понравился один эксперимент, описанный Biozzi (5-я сессия). Было показано, что большинство слабо отвечающих мышей являлись более резистентными к пересаженной опухоли, чем сильно отвечающие мыши. Это подтверждает предсказания, сделанные на конференции по иммунологическому надзору в Brook Lodge в 1970 г., что элиминация гуморального ответа могла бы способствовать более эффективному, опосредованному клетками отторжению раковых клеток. В то время как я

представляю себе данное наблюдение как пример силы генетической методологии для раскрытия сложной и эффективной функции иммунного надзора, мне также становится ясно, что этот «факт» вводит в заблуждение. Интерпретация данных основана на том, что слабо отвечающие животные имеют генетически дефектную систему В-клеток при нормальной системе t-клеток. Следовательно, сильно отвечающие защищают опухоль с помощью эффекта усиления, в то время как слабо отвечающие не способны делать это, ибо их опосредованный клетками эффекторный механизм, который, как постулировано, является функцией Т-клеток, может осуществлять свою функцию нормально. Эти данные затем принимаются как самоочевидные, так как обычно полагают, что опосредованный клетками эффекторный механизм представляет функцию Т-клеток.

Если по обсуждаемым здесь причинам считать, что опосредованный клетками эффекторный механизм является функцией антител, происходящих из В-клеток, то отторжение опухоли у мышей Biozzi обнаруживает другую связь. Предположим, что функция ассоциативного распознавания t-клеток идентична у слабо и сильно отвечающих мышей в опытах Biozzi. Тогда неспецифическое ослабление функции В-клеток можно было бы показать с помощью определения сывороточных антител при отсутствии ослабления клеточной эффекторной функции. Трудность в том, что методы определения сывороточных антител в опытах Biozzi являются количественными, в то время как методы определения клеточного иммунитета — качественными, т. е. выше определенного порога активности опухоль отторгается, а ниже этого порога — нет.

Немедленно возникает предположение о причинах этого феномена. Во-первых, в то время как скорость синтеза «клеточных» антител может уменьшаться, подавление их синтеза сывороточными антителами также уменьшается по системе обратной связи. Следовательно, эффективный стабильный уровень реактивности клеток не может быть снижен слишком сильно. Во-вторых, в равновесии между протекцией и отторжением важно не только их соотношение, но и абсолютный уровень каждого феномена.

В том случае (сильно отвечающие), когда равновесие поддерживалось, но уровни усиливающих антител и антител-«киллеров» одинаково уменьшались, преимуществом пользовалась функция отторжения. Так как опосредованное клетками отторжение, возможно, осуществляется через многоточечное взаимодействие (образование мостиков) между «киллерами» и клетками-мишенями в отсутствие эффекта усиления, эффективность усиления будет уменьшаться быстрее, чем опосредованное клетками умерщвление, ибо уровень обеих активностей пропорционально уменьшен. Другими словами, даже если не заблокированы только 1—10% детерминант на клетке-мишени, клетки-«киллеры» могут еще эффективно функционировать (см. IV, Б).

Сильно и слабо отвечающие мыши Biozzi имеют множество генетических различий. Так как контроль ответа на эритроциты барана сцеплен с алло-типом тяжелых цепей, одно из этих различий сцеплено с локусом $Ig-V_H^B$. Однако в действительности нет доказательств, что активности ассоциативного распознавания t-клеток слабо и сильно отвечающих животных подобны, другими словами, что они также не различаются по локусу $Ig-I$. Фенотип «общий низкий ответ эффекторных антител» может контролироваться одним локусом (или в данном случае многими локусами). Как мудро заметил Herzenberg (5-я сессия), было бы весьма полезно осуществить возвратное скрещивание каждого слабо и сильно отвечающего животного, несущего $Ig-V_H^B$ и $Ig-V_H^T$ в конечном сочетании.

IV. РЕЦЕПТОРЫ t-КЛЕТОК ЯВЛЯЮТСЯ IgM-ПОДОБНЫМИ ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ

Вернемся к тому, что известно о иммуноглобулиновой природе ассоциативных антител, прежде всего рассмотрев положительные данные. Противоположных данных я коснусь позднее (раздел IV, Б).

А. Данные за это предложение

Данные о свойствах ассоциативных антител заключаются в том, что ассоциативные антитела, секретлируемые индуцированными клетками, происходящими из тимуса, действуют цитотоксично на «прикрепляющиеся клетки» (индукция эффекторных клеток) селезенки или перитонеального экссудата и являются молекулами иммуноглобулина с молекулярной массой 180 000, несущими детерминанты, перекрестно-реагирующие с IgM, продуцируемым В-клетками. Это согласуется с исследованиями Hammerling и Rajewsky («Eur. J. Immunol.», 1971, v. 1, p. 447) и Marchalonis e. a. («Biochemistry of gene expression in higher organisms, Lee a. Pollak eds. Australia and New Zealand Book Company, Sydney, 1972); Warner (4-я сессия), что клетки, происходящие из тимуса, имеют на своей поверхности молекулу, связанную иммунологически с IgM. Исследования Lesley, Kettman, Dutton («J. Exp. Med.», 1971, v. 134, p. 618) показывают, что ассоциативные антитела несут детерминанты субъединиц каппа. Этот факт в отсутствие веских контраргументов может свидетельствовать о том, что локус Ig-1 кодирует особые элементы IgM-подобной тяжелой цепи, т. е. одну из субъединиц ассоциативных антител, не κ или λ .

Б. Данные против этого предложения

Перечисленные выше эксперименты, на основании которых пришли к выводу, что рецепторы t-клеток являются иммуноглобулинами, горячо дебатировались на этой конференции. Имеется два контраргумента:

— поиски связанного с мембраной иммуноглобулина на клетках тимуса и происходящих из него с помощью биохимических методов дали отрицательные результаты;

— при использовании методов (иных, чем кооперация), с помощью которых, как предполагают, измеряется индуцированная активность клеток, происходящих из тимуса, не было получено доказательств (или они были сомнительные), что в этом замешаны иммуноглобулиновые рецепторы.

Uhr и Upance (4-я сессия), описывая удручающе отрицательные эксперименты, не подтверждают данных Dutton, Feldman, Hammerling, Marchalonis, Rajewsky, Warner. Кажется, что клетки тимуса и клетки, происходящие из тимуса (несущие поверхностный θ -маркер), не имеют каппа-рецепторов, подобных IgM. Мое предположение заключается в том, что эти различия будут зависеть от небольших, но важных экспериментальных деталей, которые станут ясными, когда каждая группа повторит работу других. Демонстрация Uhr, что более 90% лизиса θ -несущих клеток с помощью анти- θ -сыворотки и комплемента не имеет заметного эффекта на синтез иммуноглобулинов суспензиями клеток из тимуса, предполагает, что различия между данными двух групп исследователей получаются из-за различий в методиках выделения иммуноглобулинов, связанных с мембранами t-клеток. Ясно, что в данный момент Uhr и Upance поколебали корабль, но не утопили его.

Simonsen указал, почему отрицательные эксперименты, в которых использовались методы клеточного иммунитета для оценки функции клеток, происходящих из тимуса, могут быть ложными, и сделал заключительный вывод, что только выделение и химическая характеристика постулированного неиммуноглобулинового рецептора на клетках, происходящих из тимуса, явится убедительным аргументом. Я согласен с ним, но это только возвращает нас к предварительной дискуссии.

Нельзя отбрасывать эти пространные и противоречивые исследования. Основным аргументом в пользу неиммуноглобулинового рецептора Т-клеток заключается в том, что антииммуноглобулиновая сыворотка различных видов не подавляет (или подавляет неустойчиво) клеточную реактивность. В большинстве исследований этого рода не сделано различий между индуцирующими и эффекторными механизмами. Однако имело бы смысл обсудить предположение, что блокирующий с помощью антииммуноглобулиновой сыворотки механизм и приводит к наблюдаемому конечному эффекту. Три фактора могут играть роль во всех использованных тест-системах. Прежде всего, в то время как чувствительность методов клеточного иммунитета обычно очень высокая, их количественные характеристики очень плохие. В большинстве случаев неизвестно, как было определено уменьшение количества индуцированных антигенчувствительных клеток, не говоря уже об уровне эффекторных антител. Что иногда известно — это отношение между вводными данными и уровнем (но не скоростью) конечного ответа (индуцирующая плюс эффекторная функция). Это подразумевает, что подавление антисывороткой в 2—10 раз скорости индукции, или эффекторной функции, может не отражаться на конечном ответе, определенном позднее. Это еще не может объяснить всех отрицательных результатов. Во-вторых, неизвестно, насколько антииммуноглобулиновая молекула может блокировать взаимодействие клетки с клеткой. Константа связывания $K_{дпсс}$ взаимодействия белка с антителами к белку должна быть порядка 10^{-6} М. В условиях большинства опытов в среднем от 1 до 10% рецепторов, связанных с клетками, должны быть свободны. Если эти временно свободные рецепторы реагируют с детерминантами мишени (при кооперации или лизисе), клетки могут необратимо сцепиться вместе, во-первых, через взаимодействие специфических рецепторов, во-вторых, через вторичное «неспецифическое» взаимодействие, и, таким образом, связанные рецепторы будут недоступны для антисывороток. В тщательно поставленном опыте наблюдалось бы первоначальное подавление антисывороткой темпов ответа, а затем постепенное освобождение от подавления. Если исследуются только отдаленные сроки, то антисыворотка или ингибитор может не повлиять на окончательный результат. Характерный пример такого феномена дают Faarnes, Choi, Good («J. Exp. Med.», 1973, v. 137, p. 171), рассматривающие свои результаты как «антигенную модуляцию». В-третьих, антииммуноглобулиновые сыворотки, возможно, обладают какой-то усиливающей активностью, маскирующей ингибирующее действие. Например, цитофильные антитела даже через межвидовые барьеры могут вооружать эффекторные клетки, распознающие мишень.

Опыты Grove с соавт. («Transplant Rev.», 1972, v. 10, p. 36) служат моделью для доводов, что рецептор Т-клетки не является иммуноглобулином. Экспериментальной системой является РТПХ, которую определяют по увеличению селезенки куриного эмбриона после инъекции зрелых несовместимых лимфоидных клеток. Основным результатом заключается в том, что кроличьи антисыворотки к легким цепям не блокируют РТПХ *in vivo*, тогда как куриные антисыворотки, полученные при перекрестной иммунизации,

блокируют РТПХ, если эти антисыворотки направлены против зрелых клеток донора. Неспособность кроличьих антисывороток против легких цепей блокировать РТПХ *in vivo* может иметь различное происхождение. Некоторые возможные механизмы я рассмотрел выше, а другие упоминают Сгопе с соавт. К сожалению, они наряду с блокированием не тестировали лизиса с участием комплемента *in vitro* для выяснения влияния антисывороток против легких цепей на реактивность в РТПХ донорских клеток. Так или иначе, это отрицательный результат, не приобретающий большего смысла из-за того, что РТПХ может быть заблокирована антисыворотками против антигенов локуса В1 или против В2. Трактовка такого важного наблюдения зависит от специфичности подавляющих антител в анти-В-сыворотках. Возможно, что существуют антитела, направленные против идиотипа рецепторов t- и В-клеток, а также против любых других полиморфных поверхностных детерминант. Подавление «антиидиотипом» может действовать на уровне индукции (t-клетки) или эффекторной функции (В-клетки?) путем блокирования ассоциативных либо эффекторных антител. Антиидиотипическая сыворотка может блокировать РТПХ, тогда как антисыворотка против легких цепей может ее не блокировать, так как первая сыворотка будет реагировать с переменным участком комплекса легких и тяжелых цепей и, таким образом, блокировать место связывания, а вторая будет направлена в основном против константного участка только легких цепей и не будет блокировать взаимодействие с антигеном.

Далее, как отмечают Сгопе с соавт., куриный эмбрион вырабатывает иммуноглобулин с детерминантами легких цепей, который связывает антисыворотку против легких цепей.

Следует заметить, что во всех случаях антисыворотки, полученные при изоиммунизации, эффективно блокировали клеточный ответ на антиген (см. примеры у Green, 1-я сессия, раздел V, Б, 1; Ramseier, Lindemann. — «Transplant. Rev.», 1972, v. 10, p. 57).

На основании косвенных данных, я предполагаю, что в опытах Green (1-я сессия, раздел V, Б, 1), Сгопе с соавт. активность антисывороток также была обусловлена антиидиотипической или антиаллотипической специфичностью.

Облаченный в броню вывод Simonsen скрыт под словами о том, что на t-клетках существуют особые «архаические или примитивные» рецепторы, ответственные исключительно за распознавание основных детерминант тканевой совместимости. Эти слова представляются безнадежно устаревшими, особенно если В-локус у кур аналогичен локусам H-2 или HZ-A (раздел V, В). Данное предположение означает, что каждый аллель должен вырабатывать продукт, распознающий продукт всех остальных аллелей, но не себя. Данная формулировка игнорирует: 1) тот факт, что рецепторы t-клеток с высокой степенью специфичности распознают широкий диапазон детерминант, не относящихся к тканевой совместимости (раздел V, Б); 2) то, что в процессе эволюции на антиген гистосовместимости, предположительно действующий как рецептор, и на рецептор, предположительно действующий как антиген гистосовместимости, влияли различные селекционные воздействия (раздел V, В); 3) критику Bodmer теории Jergne, применимую и в данном случае, а именно, что было бы нереалистично требовать строго параллельной эволюции на уровне популяций генов, кодирующих редкие детерминанты антигенов тканевой совместимости, и генов, кодирующих их распознавание (Bodmer. — «Nature», 1972, v. 237, p. 139); 4) тот факт, что для осуществления специфической толерантности и индукции необходима клональная селекция антигенов гистосовместимости; 5) об-

щее поведение (как эффекторную функцию, так и ассоциативное распознавание) иммунной системы игнорируется при попытке объяснить одно наблюдение — иммунное распознавание основных детерминант тканевой совместимости.

В нашей дискуссии следует ясно сказать о том, как мы рассматриваем соотношение между основными генами тканевой совместимости, например К и D у мышей и FOUR и LA у человека, и генами, кодирующими рецепторы t-клеток, Ig-1, иначе мы обречены на недоразумение. Если предположить, что «архаические или примитивные» рецепторы t-клеток являются только основными антигенами тканевой совместимости, например К и D у мышей, отличающимися от продукта локуса Ig-1, то перед нами встает особая проблема клеточной эффекторной функции, не связанной с проявлением закодированных Ig-1 ассоциативных антител. Мне кажется, что сторонники двух гипотез: 1) что основные антигены тканевой совместимости, проявляющиеся на всех клетках, являются также «архаическими» рецепторами на t-клетках, специфическими к их собственным аллельным продуктам, и 2) что цитотоксический клеточный эффект и ассоциативное распознавание являются эффекторными функциями антигенчувствительной t-клетки, должны представить нам формальные доказательства этих гипотез.

В. Другие взгляды на рецептор t-клеток

Какое значение имеет факт, признанный почти всеми, что рецепторы на t-клетках трудно обнаружить при помощи различных методик, выявляющих рецепторы В-клеток? Мне кажется, что отрицательные опыты произвели такое большое впечатление на этой и предыдущей конференциях в Brook Lodge («Immunologic Intervention». Academic Press. N. Y., 1971, p. 175 — 181) по чисто психологической причине. Нас застали во время сна. Не было никаких оснований ожидать, что так трудно обнаружить рецепторы на антигенчувствительных клетках тимусного происхождения по сравнению с рецепторами на антигенчувствительных клетках костномозгового происхождения и что они будут кодироваться другими локусами. Многие авторы, которым неожиданность придала смелости, стали сторонниками двух догадок о характере рецептора t-клеток, кодируемого Ig-1 и участвующего в клеточной кооперации. Эти догадки состоят в том, что либо ассоциативные антитела (рецептор t-клеток) представляют собой специфическую «молекулу распознавания», не состоящую из иммуноглобулина, либо что продукт Ig-1 является поверхностным компонентом, изменяющим специфичность иммуноглобулинового рецептора. В моем первоначальном списке эти предположения обозначены номерами 3 и 4.

Некоторые из вас, несомненно, стремясь уйти от прямого ответа, предпочитают первую догадку, так как вы считаете, что тем самым можете не защищать положение, что антигенчувствительная клетка тимусного происхождения полипотентна. Молчаливо предполагается, что, если иммуноглобулин не участвует в распознавании, то возможны новые правила, т. е. нет необходимости в клональной селекции (Benacerraf, 1-я сессия; Benacerraf, McDevitt. — «Science», 1972, v. 175, p. 273). Другие предпочитают последнюю догадку, так как считают, что она помогает объяснить сцепление и локализацию Ig-1 в комплексе H-2 (McDevitt e. a. — «J. Exp. Med.», 1972, v. 135, p. 1259). Действительно, Benacerraf и McDevitt («Science», 1972, v. 175, p. 273) пытались даже сделать обобщение, предполагая, что все Ig-локусы сцеплены с локусами тканевой совместимости ввиду функциональной связи между двумя типами локусов, требующей сцепления для ре-

гуляции их проявления. Я назвал эти два предположения догадками, во-первых, потому, что я лично вкладываю в эти слова свое представление об их правоте, во-вторых, в связи с тем, что эти догадки не представлены в виде доказательной гипотезы.

Обсуждая анализ генетики Ig-1, предложенный McDevitt (2-я сессия), Herzenberg и Bodmer возражали, что разница между гипотезами, кодирует ли Ig-1 иммуноглобулиновый или неиммуноглобулиновый рецептор t-клетки, является чисто семантической. Отчасти это верно, и поэтому я отмечаю, что основные расхождения между ними касаются не характера рецептора t-клетки. Однако я все же различаю две гипотезы не потому, что разница между ними велика, а чтобы подчеркнуть важность биохимических исследований рецептора t-клетки. Здесь иммуноглобулином мы называем антитела, в которых субъединицами являются каппа, ламбда или тяжелая цепь, сцепленная с аллотипом. Далее (в разделе V, B) я рассмотрю предположение Bodmer о возможной эволюции продукта Ig-1, на основании которого он утверждает, что расхождения являются семантическими.

Допущение, что Ig-1 кодирует не иммуноглобулиновый рецептор T-клеток, будет преследовать нас в принципе, пока этот рецептор не сможет быть выделен и охарактеризован при помощи общепринятой методики. Я мог бы покончить пока с этими допущениями, но, как вы увидите дальше, когда я буду говорить о физиологических требованиях и о специфичности этого рецептора, а также об эволюции иммуноглобулина, это допущение оказывается преждевременным, так как оно по существу означает изобретение иммуноглобулина заново. Все же это любопытная мысль, ибо она помогает убедиться, в какой мере структуру иммуноглобулина можно объяснить общими принципами. Требуется ли большой диапазон распознавания взаимодействия неидентичных субъединиц варибельного участка? Требуется ли «области», отделяющие распознавание, например Fab, от функции, например Fc? Требуется ли для возникновения разнообразия соматическая селекция замещений в гиперварибельных участках? Селектируются ли гены Ig-1 гамет по тем же параметрам, что и известные структурные V-гены, т. е. по специфичности, имеющей значение для выживания?

Более коварно допущение, что Ig-1 кодирует модулирующий элемент, действующий на рецептор иммуноглобулина. Это допущение предполагает, что либо ассоциативные антитела не действуют как секретируемая или цитотоксическая молекула, либо секретируется модулирующий элемент, а функция возникает в дальнейшем. Если бы это было не так, то специфичность рецептора индуцированной t-клетки и ассоциативных антител, действующих на индукционную эффекторную клетку, была бы различной. Кроме того, данная модель нуждается: 1) в некоторых уточнениях механизма модуляции, так как на основании того, что мы знаем о структуре белков, она бессмысленна, и 2) в объяснении феномена специфического доминантного сильного и слабого ответа, которая зависит не от рецептора, а от моделирующего элемента, кодируемого Ig-1.

Представим себе рецепторную молекулу или ассоциативные антитела как легкую цепь, тяжелую цепь и моделирующую субъединицу. Как детерминируется разница между сильно и слабо отвечающим животным геном гамет, кодирующим модулирующий элемент? Существует ли механизм для проявления соответствующего гена Ig, который определяет разницу между сильным и слабым ответом каждый раз, когда на T-клетке появляется рецептор анти-(T, G)-A-L, или же все гены Ig проявляются в каждой T-клетке; в этом случае как детерминируется специфичность? Все эти вопросы нуждаются во вдумчивом обсуждении, которое несомненно будет плодотворным.

Сказав все это в «порядке упражнений в своем литературном стиле», я считаю, что наиболее вероятным продуктом локуса Ig-1 является тяжелая цепь, подобная IgM, которая соединяется с известными субъединицами каппа и ламбда и образует иммуноглобулиновый рецептор. Это означает, что наборы генов V_H , проявляющихся в В- и t-клетках, находятся в несцепленных локусах.

V. ТРИ СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРА t-КЛЕТОК

Я отмечал, что основные расхождения между нами касаются не характера t-клеточного рецептора, кодируемого Ig-1, а трактовки его роли и проявления. Для того чтобы обратиться к этой проблеме, я допущу, что данный t-клеточный рецептор должен обладать тремя свойствами, имеющими прямое отношение к нашей дискуссии:

— Его проявление должно регулироваться, чтобы достигнуть оптимального распознавания «своего» и «чужого».

— Его степень и диапазон специфичности должны быть такого же порядка, как у рецептора В-клеток: отсюда следует вывод, что локус Ig-1 должен характеризоваться аллельным исключением.

— Рецептор должен находиться на поверхности, быть высокополиморфным и, следовательно, должен выявляться общими методиками, применяемыми для анализа детерминант тканевой совместимости.

A. Асимметрия отношения между t- и В-клетками

В связи с первым свойством мы должны рассмотреть асимметрию в соотношении между ассоциативными и эффекторными антителами. Это поможет нам понять, почему мутации в локусах Ig-1 и $Ig-V_H^B$ проявляются по-разному, и предсказать, как могут действовать мутации на $Ig-V_\lambda$ или $Ig-V_\mu$. Согласно основному допущению, механизм индукции и паралича проявления ассоциативных антител должен быть таким же, как и эффекторных антител. Я изобразил это на рис. 83. Асимметрия соотношений между ассоциативными антителами, вырабатываемыми клетками тимусного происхождения, и другими иммунными компонентами, иллюстрируется следующей схемой (рис. 84), которую я заимствовал из недавней статьи Bretscher («Transplant Rev.», 1972, v. 11, p. 218).

Во-первых, отметим симметрию. На схеме показаны две антигенчувствительные клетки: В и t. После индукции В-клетка дифференцируется и превращается в плазмоцит, секретирующий иммуноглобулин и обозначенный буквой П. Предполагается, что ассоциативные антитела действуют цитотоксично, следовательно, секретирующая клетка Т должна быть продуктом дифференцировки t-клетки. Эта Т-клетка на схеме совершенно аналогична плазмоциту П, образуемому при индукции В-клетки. Известно, что индукция В- и t-клеток радиочувствительна, тогда как функция П- и Т-клеток — резистентна к рентгеновым лучам, как и следовало ожидать, ибо индукция требует, а секреция конечной клетки не требует деления. Как В-, так и t-клетки нуждаются в ассоциативных антителах для индукции, но не для паралича.

Асимметрия возникает вследствие того, что ассоциативные антитела, обязательные для индукции t- и В-клеток, являются продуктом индуцированной t-клетки. Следовательно, для индукции В-клеток нужны t-клетки, но не наоборот. На рис. 83 это представлено стрелкой со словом «стимулирует», идущей от Т-клетки к В- и t-клеткам. От П, т. е. конечной стадии

дифференцировки В-клеток, соответствующая стрелка не отходит. Наоборот, показана стрелка со словом «подавляет», обозначающая общеизвестное подавление индукции по принципу обратной связи эффекторными анти-телами.

Разобравшись в этой асимметрии, мы можем теперь обратиться к теоретическим и наблюдаемым в эксперименте соотношениями между В- и t-клетками у животных, различных по локусам Ig-1 и не-Ig-1.

1. ОПЫТЫ SHEARER

Исследования клеток были проведены Shearer, чтобы самостоятельно проверить гипотезу, основанную на генетических данных (раздел II, В), о том, что гены Ig-1 проявляются только в t-клетках, а гены $Ig-V_H^B$ — только в В-клетках. Очевидно, можно было бы исключить, что t- и В-клетки обладают потенциальной способностью проявлять идентичные рецепторы, как можно было бы ожидать, если бы Ig-1 был локусом каппа. К сожалению, имеющиеся материалы не позволяют дать ответа.

Однако они позволяют обнаружить зависимость антигенов от тимуса, что определяется другими Ig-генами [т. е. не геном Ig-1, например, к (Ф, Г)-Про-Л] и сделать ограниченное число выводов об особенностях В-клеток.

В общем опыт заключается в восстановлении облученных животных либо постоянным числом сингенных тимусных клеток (источник t-клеток) и различными количествами сингенных костномозговых клеток (источник В-клеток), либо наоборот. У каждой мыши определяется пороговый уровень индуцированных антител, и она оценивается как отвечающая или не отвечающая. По построенной кривой титрования можно определить единицу ответа как число клеток в изменяющейся лимитирующей популяции, которая дает 50% отвечающих животных. Следует ожидать, что у двух конгенных мышей, одна из которых отвечает слабо, а другая сильно, должно наблюдаться различное число единиц ответа в популяциях t- или В-клеток. Тест на пороговый ответ определяет данное постоянное число индуцированных В-клеток. Это число является какой-то частью общего числа В-клеток, которые можно было бы индуцировать при нелимитирующем уровне ассоциативных антител, т. е. при максимальной индукции. Эта относительная часть зависит от эффективности индукции. По существу организм мыши восстанавливают путем изменения отношений t- и В-клеток таким образом, что ответ будет одинаков у двух линий. Вопрос в том, чтобы объяснить, что означает отношение. Для любой трактовки необходимо доказать, что неизменяющаяся популяция не лимитирует ответ. Это можно было бы доказать, установив, что 10-кратное увеличение неизменяющейся популяции не влияет на кривую титрования изменяющейся популяции. Иными словами, роль неизменяющейся популяции в эффективности индукции должна быть экспериментально установлена одинаковой для двух линий. Я могу добавить, что в поставленных опытах это не было бесспорно доказано.

Представим себе две конгенные линии l (со слабым ответом) и h (с сильным ответом), для которых мы хотели бы определить, различны ли популяции t- или В-клеток по количеству клеток или аффинитету рецепторов.

Каждая популяция t-клеток t_l и t_h остается постоянной на нелимитирующем ответ уровне при титровании t_l по отношению V_l и t_h по отношению к V_h . Если кривые титрования V_l и V_h различны, то это будет убедительно говорить о том, что две популяции обособлены друг от друга, т. е. различаются по количеству клеток или аффинитету рецепторов, специфичных для тест-антигена. Отсюда следует вывод, что один фактор, определяющий разницу меж-

ду слабой и сильной отвечаемостью у двух конгенных линий l и h , обусловлен популяциями В-клеток. Идентичные кривые позволяют только предположить, что популяции идентичны, так как большие различия по аффинитету рецепторов В-клеток могут быть замаскированы при использовании полимерных антигенов, которые придают достаточно высокий аффинитет взаимодействию между рецептором и антигеном, и таким образом за данный срок опыта достигается пороговый уровень индукции.

Теперь представим себе, что каждая популяция В-клеток остается постоянной на не лимитирующем ответ уровне, определенном путем титрования по отношению к соответствующей популяции t -клеток, т. е. V_1 по отношению к t_1 и V_h по отношению к t_h . Если бы популяции В-клеток были идентичны (на это допущение указывают первые титрования), то были бы получены идентичные кривые титрования при условии идентичности популяции t -клеток. Такой результат убедительно говорил бы о том, что популяции t - и В-клеток одинаковы в смысле эффективности индукции, но не объяснил бы разницу между слабым и сильным ответом. Однако важно, что если титруются две идентичные популяции t -клеток — одна по отношению к популяции В-клеток с низким, а другая с высоким аффинитетом, — то можно получить две разные кривые титрования. Далее, разница между кривыми будет сильно зависеть от концентрации антигена. При концентрации антигена, оптимальной для индукции, популяция В-клеток с низким аффинитетом требовала бы больше t -клеток, чтобы получить единицу ответа, чем популяция В-клеток с высоким аффинитетом. Это замечание остается в силе, даже если популяция В-клеток не лимитирует ответ при оптимальной концентрации антигена для сингенной популяции t -клеток. Если применяют концентрации антигена выше или ниже оптимальной, то разница только увеличивается вследствие дифференциального иммунопаралича двух популяций В-клеток. Влияние концентрации антигенов не было изучено и так или иначе его было бы трудно правильно контролировать.

Две разные популяции t -клеток могут быть установлены на нелимитирующем уровне при титровании t_1 по отношению к V_1 и t_h по отношению к V_h и использованы для дифференцировки V_1 от V_h , тогда как обратное невозможно. Это обусловлено асимметрией их соотношения. Поскольку ассоциативные антители не лимитируют ответа у восстановленной мыши l или h , любые различия между ними по В-клеткам, выявленные титрованием, вероятно, реальны, т. е. обусловлены различным количеством клеток или различным аффинитетом рецепторов для тест-антигена. По существу при нелимитирующих количествах t -клеток уровень индукции будет зависеть только от В-клеток. Напротив, если две популяции В-клеток l и h установлены так, чтобы не лимитировать ответ каждой перестроенной линии мышей, то две популяции t -клеток могут быть идентичны, но давать разные результаты титрования, так как эффективность индукции будет зависеть от различий по аффинитету рецепторов, т. е. эффективность индукции должна быть ниже для популяции В-клеток с рецепторами меньшего аффинитета. Я понимаю, что перекрестное титрование t_1 по отношению к V_h и t_h по отношению к V_1 нельзя исследовать таким образом из-за феномена аномальной индукции (раздел VI). Однако тот же самый феномен в принципе показывает, как можно анализировать ответ t - и В-клеток у конгенных линий без осложнений, вызванных эффективностью индукции, связанной с ассоциативным распознаванием. Уровень индукционного сигнала 2 можно избрать так, чтобы он не лимитировал ответ и не зависел от тест-антигена. Я делаю это замечание мимоходом, и надо полагать, что в будущем таким образом можно будет анализировать различия t - и В-клеток.

В принципе анализ Shearer сможет установить, проявляются ли в В-клетках различия ответа, контролируемые Ig-1, но его предварительные данные (1-я сессия, рис. 10, табл. 17, 18 и 19) весьма сложны. Отчасти это объясняется полигенными различиями между линиями C57BL/6, C3H, SJL и, в частности, мыши SJL имеют особо «гиперреактивную» клеточную систему («East Prog. Exp. Tumor, Res.», 1970, v. 13, p. 84; Herzenberg, Jacobson, Herzenberg, Riblet. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 212), что может исказить ответ вследствие наложения механизма аномального подавления. Часть опытов не была проведена после того, как было доказано, что участие t- или В-клеток не лимитирует ответ. Могу добавить, что использование порогового теста на наличие ответа было бы менее показательным, чем количественный тест с изучением уровней антител в сыворотке. Я сознаю трудности, вызванные смертью животных, если использовать очень низкие дозы восстановления костным мозгом. Однако эти трудности не влияют на критические точки в кривых. Далее я не уверен в том, что такая сложная серия взаимодействий поддается простому статистическому анализу данных и, действительно, результаты титрований не следуют распределению Пуассона для пороговых величин ответа (рис. 10, табл. 17, 18, 19). Наконец, в отношении ответа, контролируемого Ig-1, я не уверен, что даже убедительное доказательство различия уровня В-клеток или аффинитета к тест-антигену позволит сделать ясный вывод, что источником различия является проявление Ig-1 в В-клетках. С другой стороны, даже используя мышей, конгенных по локусу Ig-1, если бы у сильно отвечающих животных ответ В-клеток имел бы такой же уровень, как у слабо отвечающих, мы могли бы заключить, что обе линии животных перед опытом подвергаются иммуногенной селекции перекрестно-реагирующими антигенами, содержащимися в среде, что маскирует предполагаемое различие В-клеток, кодируемое Ig-1 (кстати, скрытая иммунизация отчасти объясняет, почему полиморфизм генов Ig, кроме локуса Ig-1, выявляется так редко, хотя, вероятно, он должен встречаться часто). С другой стороны, если бы уровень ответа t-клеток зеркально отображался уровнем В-клеток, мы могли бы заключить, что тест-антиген случайно состоит из детерминант, которые всегда находятся в сопряженном виде и, таким образом, высокий уровень t-клеток селекционирует высокий уровень В-клеток, а низкий уровень t-клеток должен сопровождаться низким уровнем В-клеток.

Таким образом, локус Ig-1 может не проявляться в В-клетках, но это впечатление может сложиться по посторонней причине.

В таких условиях можно ли обнаружить специфическую доминантную разницу ответа, контролируемого другими Ig-локусами, кроме Ig-1? Обычно ответ на антиген лимитируется уровнем ассоциативных антител. Это обусловлено тем, что они регулируют распознавание «своего» и «чужого», по этой причине также чаще всего выявляются различия, контролируемые Ig-1. Для того чтобы искать различия, контролируемые другими Ig-локусами, надо, чтобы ассоциативные антитела не лимитировали скорость индукции В-клеток, специфических для тест-антигена. В общем для достижения этой цели можно было бы пользоваться сложным антигеном, общий ответ на который был бы одинаков у всех линий. Однако если исследуется эффекторный гуморальный ответ на разные детерминанты этого комплексного антигена, так, чтобы проанализировать ответ ограниченных субпопуляций В-клеток, то могут выявиться различия между линиями, не сцепленные с Ig-1. Приведу пример. Ответ на (Ф, Г)-Про-Л, описанный Shearer (1-я сессия), имеет следующие свойства: у мышей SJL количество В-клеток против Про, Л, по-видимому, в 5 раз больше, чем против Ф, Г при исследованиях в присут-

ствии избытка t-клеток, тогда как у мышей DBA наблюдаются прямо обратные соотношения В-клеток. Это соответствует наблюдению, что мыши SJL сильно отвечают на детерминанту Про, Л и слабо отвечают на детерминанту Ф, Г, а мыши DBA обладают противоположным свойством.

При исследовании t-клеток SJL в присутствии избытка В-клеток не обнаруживается разницы по их количествам независимо от того, определяются ли гуморальные антитела к Про, Л или к Ф, Г. То же самое относится и к t-клеткам мышей DBA.

Отсутствие различий между кооперативными t-клетками, специфическими к (Ф, Г)-Про-Л, может означать, но не обязательно означает, что две линии SJL и DBA имеют идентичный продукт гена Ig-1 для распознавания этого антигена. Даже если бы на уровне t-клеток одна линия распознавала только Ф, Г, а другая — только Про, Л, то тест Sheager мог бы не выявить различий, так как ассоциативное распознавание одной детерминанты допускает кооперацию для всех других детерминант. Это — общий эффективный уровень ассоциативного распознавания и тест Sheager не может различить две линии. Можно обнаружить начальное различие ответа двух популяций В-клеток на данную детерминанту Ф, Г или Про, Л, так как эффективный уровень В-клеток, связанный с их количеством или аффинитетом рецепторов, лимитирует ответ у соответствующих слабо отвечающих линий.

Эти данные означают, что в тех условиях, в которых участие t-клеток не является лимитирующим, тест Sheager на различие В-клеток достоверен. Либо мышь надо экспериментально восстановить таким образом, чтобы участие t-клеток не было лимитирующим, либо надо избрать условия, в которых участие t-клеток обычно не лимитирует ответ, например, ответ на (Ф, Г)-Про-Л у мышей или ГАТ у морских свинок (раздел V, А, 2).

2. ОПЫТЫ VENACERRAF

Венасеггаф (1-я сессия, табл. 2 и 10) отмечает довольно неожиданное наблюдение, не интерпретируя его достаточно точно. Это наблюдение, согласно его описанию, заключается в том, что у морских свинок наблюдается разница по ответу на антиген ГА. Эта разница контролируется Ig-геном, сцепленным с THS. Очевидно, ответ контролируется локусом, аналогичным Ig-1, который детерминирует специфичность распознавания ассоциативными антителами t-клеток. Животные, слабо и сильно отвечающие на ГА, одинаково отвечают на ГАТ. Поражает утверждение Венасеггаф, что только те животные, которые сильно отвечают на ГА, так как имеют соответствующий аллель Ig-1, вырабатывают сывороточные антитела против ГА при иммунизации ГАТ. Если бы мнение Венасеггаф было правильным (т. е. что сывороточные антитела против ГА наблюдаются лишь у морских свинок, имеющих ген ГА, который находится в локусе Ig-1), то рецепторы t- и В-клеток, по всей вероятности, имели бы общую субъединицу. Действительно, это наблюдение позволяло бы утверждать, что Ig-1 является локусом каппа. Дело в том, что общий ответ на ГАТ примерно одинаков у всех морских свинок, следовательно, в этом случае ассоциативные антитела к ГАТ, происходящие от t-клеток, не могут лимитировать ответ В-клеток на детерминанты ГА. Если бы ответ В-клеток лимитировался геном ГА, сцепленным с Ig-1, то Ig-1 должен был бы проявляться как в В-клетках, так и в t-клетках. Согласно сказанному, в этом случае Ig-1 должен был кодировать детерминанту каппа.

К сожалению, если присмотреться к этому опыту, становится понятным, что он не может быть использован для проверки гипотезы о том, что локус

Ig-1 кодирует цепь каппа. Возможно участие двух Ig-локусов. Генетические исследования, показывающие сцепление ответа на ГА с MHS, проводятся на морских свинках линии 2 и 13 (табл. 2). Ответ на ГАТ исследуется на морских свинках Hartley. В этом последнем случае генетическая карта не составляется, но способность вызывать клеточную реакцию на ГА у животных, иммунизированных ГАТ, рассматривается как критерий наличия или отсутствия гена Ig-1, контролирующего ответ на ГА (табл. 10). Между положительной реакцией ГЧЗТ на ГА и активностью против ГА сыворотки морских свинок, иммунизированных ГАТ, найдена абсолютная корреляция. Можно сомневаться в том, что индукция клеточной реактивности как тест ассоциативных антител, кодируемых Ig-1, чем-либо отличается принципиально от теста на индуцированные сывороточные антитела, поэтому абсолютная корреляция понятна, но она не говорит нам, какой Ig-локус контролирует ответ к детерминанте ГА у животных, иммунизированных ГАТ: Ig-1, Ig—V_H^B, Ig—V_κ или Ig—V_λ. Все основные физиологические опыты еще впереди. У линии 2 и 13 морских свинок, иммунизированных ГАТ и тестируемых ГА, не должно быть различий, если Ig-1 проявляется только в t-клетках. Если бы дело было только в различиях по Ig-1, то морские свинки Hartley, иммунизированные ГА и тестируемые ГА, дали бы те же результаты, что и линии 2 и 13, но если ответ контролируется двумя несцепленными локусами, например Ig-1 и Ig—V_H^B, то следовало бы ожидать таких соотношений между генотипом и фенотипом у морских свинок Hartley (табл. 141).

ТАБЛИЦА 141

Связь генотипа Ig-1 и Ig—V_H^B с фенотипом иммунного ответа у морских свинок

Антиген, использованный для иммунизации	Фенотип		Генотип	
	сывороточный или опосредованный клетками ответ против ГА	аллель ответа на ГА		
		Ig-1	Ig—V _H ^B	
ГАТ	Сильный	Слабый или сильный	Сильный	
ГА	»	Сильный	»	
ГА	Слабый	»	Слабый	
ГА	»	Слабый	Сильный	
ГА	»	»	Слабый	

Для сильного ответа на ГА при иммунизации ГАТ требуется аллель сильного ответа на ГА локуса Ig—V_H^B. Для сильного ответа на ГА при иммунизации ГА требуется аллель сильного ответа на ГА как локуса Ig-1, так и Ig—V_H^B.

Для слабого ответа на ГА при иммунизации ГА требуется аллель слабого ответа на ГА одного или обоих Ig-локусов. Если животное, слабо отвечающее на ГА, сильно отвечает при иммунизации ГАТ и тестировании ГА, то, очевидно, аллель сильного ответа на ГА локуса Ig—V_H^B должен присутствовать. Это классический результат, согласно которому у животного, слабо отвечающего на ГА, перекрестно-реагирующий ГАТ может индуцировать сильный ответ против ГА. Это ситуация «гаптен-носитель».

Однако наиболее интересный случай представляло бы предполагаемое животное, слабо отвечающее на ГА, которое имело бы аллель сильного от-

вета на ГА локуса Ig-1 и аллель слабого ответа на ГА локуса $Ig-V_H^B$ t-клеток, но оно слабо отвечало бы на ГА, если бы тестировался его ответ.

Для окончательных опытов с целью определить, детерминируется ли ответ к ГА у морских свинок Hartley двумя Ig-локусами, необходимо составить генетическую карту и произвести соответствующие скрещивания.

3. ЛОКУСЫ НЕ $IR-V_H^B$

Когда продукт Ig-1 не контролирует ответ, можно выявить различие ответов, обусловленных другими Ig-локусами. В настоящее время известен только один Ig-локус, который в эксперименте регулирует ответ — это $Ig-V_H^B$. Есть два примера ответа, которые, как утверждают, не сцеплены ни с H-2, ни с $Ig-V_H^B$. Это ответы у мышей на (Т, Г)-Про--Л и (Ф, Г)-Про--Л (McDevitt, 3-я сессия) и на стрептококковый А-углевод (Braun, Kindred, Jacobson. — «Eur. J. Immunol.», 1972, v. 2, p. 138). Однако у меня есть сомнения. Если бы у скрещенных животных действовали два фактора Ig-1 и $Ig-V_H^B$, то в опытах с (Т, Г)-Про--Л сцепление с любым из них могло бы остаться незамеченным. В отношении стрептококкового А-углевода вывод основан на исследовании линии, а не скрещивания. В этом случае у инбредных линий, первоначально полученных от скрещивания, мог произойти кроссинговер между V_H^B и C_H^B , в результате чего у отвечающего и неответающего животного мог бы быть идентичный аллотип. Хороший пример указан в связи с ответом на α -1,3-декстран (Blomberg, Geckeler, Weigert. — «Science», 1972, v. 777, p. 178) (3-я сессия, табл. 56). Скрещивание ясно доказывает, что ответ на α -1,3-декстран сцеплен с аллотипом тяжелых цепей, однако, при исследовании линий обнаруживаются две неясности: при сравнении СВС с BALB/c и BAB/14 с C57BL/6 СВА и BALB/c имеют один и тот же аллотип тяжелых цепей, но СВА отвечает слабо, а BALB/c — сильно. BAB/14 и C57BL/6 имеют один и тот же аллотип, но BAB/14 отвечает сильно, а C57BL/6 — слабо. Для стрептококкового А-углевода наблюдается идентичное распределение ответа в линиях, поэтому надо предполагать, что ответ контролирует локус $Ig-V_H^B$ и при правильном скрещивании можно установить, что ответ сцеплен с аллотипом.

Допустив, что Ig-1 не локус каппа и учитывая асимметричность соотношений между t- и В-клетками, необходимо сделать вывод, что полиморфизм генов Ig-1 влияет на ответ t-клеток прямо, а на ответ В-клеток — косвенно и только в особых условиях. Полиморфизм $Ig-V_H^B$ влияет только на В-клетки. Полиморфизм гипотетических локусов $Ig-V_x$ или $Ig-V_L$ должен прямо влиять на t- и В-клетки.

Ответ к Ф, Г или к Про--Л у мышей, иммунизированных (Ф, Г)-Про--Л, или ответ к ГА у морских свинок, иммунизированных ГАТ, надо сопоставить с ответом на α -1,3-декстран, так как все эти ответы контролируются не Ig-1 генами. Ответ на ГАТ у морских свинок Hartley аналогичен ответу на (Ф, Г)-Про--Л у мышей DBA и SJL. Популяции В-клеток каждой линии реагируют преимущественно против разных детерминант, например ГА или не ГА, Ф, Г или Про--Л, так как у каждой линии имеется свое исходное семейство генов V_H^B , проявляемых в В-клетках. В случае α -1,3-декстрана общий ответ весьма ограничен. Таким образом, нет надобности разделять его на ограниченные субпопуляции, как при ответе на (Ф, Г)-Про--Л и ГАТ. Можно было бы считать это деталью, если бы не два важных обстоятельства.

а) Предостережение в отношении «тимуснезависимости». Хотя ответ на (Ф, Г)-Про-Л не сцеплен с Ig-1, мы не знаем из экспериментов, что продукт локуса Ig-1 необходим для индукции В-клеток. На этом основан тест Shee-гег, и мы называем (Ф, Г)-Про-Л тимусзависимым антигеном.

Обычные опыты не доказывают, что ответ на α -1,3-декстран является тимусзависимым. Позднее я рассмотрю этот совершенно неясный вопрос о зависимости и независимости от тимуса (раздел V, Б, 2). Пока я хотел бы просто сказать, что наблюдаемое действие локуса Ig — V_H^B еще не означает, что для индукции не требуется ассоциативных антител, кодируемых Ig-1. Это означает лишь, что продукт Ig-1, т. е. участие t-клеток или ассоциативные антитела не влияют на ответ у слабо отвечающей линии. Ответ лимитируется аллелем слабого ответа Ig — V_H^B потому, что эффективный уровень ассоциативных антител одинаков у линий с сильным и слабым ответом вследствие чужеродного и высокополимерного характера антигена, допускающего множественное связывание с ассоциативными антителами (раздел V, А, 4).

б) Влияние соматической селекции на В-клетки, усиливающее ответ. Если общий ответ на сложный антиген одинаков у двух животных, но ответ на каждую из детерминант различен, то сила селекции не действует на слабый ответ к одной детерминанте. При ограниченном общем ответе соматическая селекция со временем превратит слабо отвечающее животное в сильно отвечающее. В этом можно убедиться на примере ответа к α -1,3-декстрану. При длительной иммунизации ответ осуществляется антителами класса IgM, перехода к IgG не наблюдается. Сильно отвечающее животное всегда продуцирует антитела класса $\lambda\mu$, тогда как слабо отвечающее — антитела класса $\kappa\mu$. Однако в конечном счете темпы синтез индуцированных антител у животных, вначале отвечающих слабо, становятся примерно такими же, как у сильно отвечающих животных. Это указывает на процесс соматической селекции, действующий на В-клетки и усиливающий ответ путем увеличения количества В-клеток или аффинитета их рецепторов. Разница ответа на разные детерминанты одного антигена может быть настолько выраженной, что сложный антиген будет вызывать почти гомогенный ответ, например, пневмококковый С-углевод. Допустим, что в данной ситуации ассоциативные антитела не действуют и имеется небольшое число изначальных комбинаций $V_L V_H$. Тогда уровень ответа В-клеток на любую детерминанту будет зависеть от числа мутаций, требуемых для того, чтобы создать необходимую специфичность к любой детерминанте. Животное регулирует общий эффекторный ответ на антиген, а не ответ к отдельным детерминантам. Если распознается несколько детерминант, некоторые из них хорошо и другие плохо, то нет селекции на силу ответа в отношении какой-то одной из детерминант. Однако если общий ответ весьма ограничен, то антиген оказывает на слабо отвечающее животное интенсивное селекционное воздействие, приводящее к повышению ответа.

Очевидно, такой же процесс селекции должен действовать и на t-клетки и в конечном счете между слабо и сильно отвечающими животными разница по ответу, контролируемому Ig-1, например на (Т, Г)-А--Л, должна исчезнуть. Однако пока это не подтверждено, если не считать некоторых малоубедительных намеков (раздел V, А, 4б). У слабо отвечающего животного устанавливается уровень синтеза IgM против (Т, Г)-А--Л на постоянном уровне в тех условиях, когда у сильно отвечающего животного происходит переключение на синтез IgG. Если теория ассоциативного распознавания верна, то, очевидно, здесь выявляется наслонившийся регуляторный механизм,

который позволяет животным, сильно отвечающим на (Т, Г)-А-Л, перейти к синтезу IgG и мешает этому переходу у слабо отвечающих животных. Далее этот механизм мог бы объяснить отсутствие перехода к IgG при слабом и сильном ответе на некоторые антигены, например α -1,3-декстран, липо-полисахарид, поливинилпирролидон и т. д.

4. t-КЛЕТКА НЕОБХОДИМА ДЛЯ ИНДУКЦИИ ВСЕХ КЛАССОВ В-КЛЕТОК

Обычно считается, что ассоциативное распознавание, если оно вообще обязательно для индукции, требуется для индукции синтеза антител класса IgG, но не класса IgM В-клетками. Я попробую рассмотреть, в каких условиях происходит индукция В-клеток, продуцирующих IgM и IgG, согласно модели ассоциативного распознавания. Индукция зависит от отношений и абсолютных количеств сигналов 1 и 2, получаемых клеткой, а также чувствительности клетки к этим сигналам. Четыре наблюдения, которые я рассматриваю в разных местах своего комментария, могут объясняться как количественно, так и влиянием чувствительности к сигналам. Эти наблюдения таковы:

— иммуногены с повторяющимися детерминантами, например многие гаптеновые детерминанты, сопряженные с мономерным носителем или полимерами, вызывают преимущественно синтез IgM;

— иммуногены без повторяющихся детерминант, например мономерные белки, вызывают индуцированный синтез антител, как класса IgM, так и IgG без рассмотренной выше избирательности;

— у слабо отвечающих животных вследствие различий по Ig-1, т. е. по эффективному уровню ассоциативных антител, имеется ответ только класса IgM, тогда как у сильно отвечающих животных наблюдается переход к синтезу антител других классов, например IgG (раздел V, А, 4а);

— аномальная индукция дает возможность животному слабо отвечающему на полимерный антиген, перейти от IgM к синтезу антител других классов (раздел VI, А).

Если бы клетки по своей природе были одинаково реактивны на сигналы 1 и 2, то различия между индукцией В-клеток, продуцирующих IgM и IgG, могли бы быть связаны только с аффинитетом их рецепторов. При использовании любого данного иммуногена, если бы аффинитет рецепторов IgM был выше, чем рецепторов IgG, то эффективная концентрация ассоциативных антител, требуемая для индукции синтеза IgG, была бы выше, чем для синтеза IgM. Это минимальное допущение, легко объясняющее различия между полимерными и мономерными иммуногенами. Однако для того чтобы объяснить тот факт, что при аномальной индукции (повышенная доза сигнала 2 при постоянном уровне сигнала 1 осуществляется переход от IgM к IgG у слабо отвечающих животных, полезно, но не обязательно дополнительное допущение о том, что клеткам, синтезирующим IgM, присуща большая чувствительность к двум сигналам (раздел VI, А).

Я буду исходить из допущения, что чувствительность В-клеток, продуцирующих IgM и IgG, одинакова, и обращусь к тому, что интуитивно понятно. Количество индукционных сигналов, которое получает клетка, чувствительная к антигену, зависит от количества рецепторов (Р) на клетке, количества молекул ассоциативных антител (А) на эффекторной клетке, концентрации антигенов (Аг) и констант связывания рецепторов (K_p) и ассоциативных антител K_A к антигену Аг. Для нормальной индукции число индукционных сигналов $1 + 2$ (см. рис. 82 и 83) равно числу образуемых комплексов РАгА. Константы связывания K_A и K_p влияют на образова-

ние индуцирующего комплекса РАгА. Чем прочнее связывание рецепторов и ассоциативных антител с антигеном, тем меньше количество ассоциативных антител необходимо, чтобы послать данное число индукционных сигналов клетке, чувствительной к антигену. Связывание рецепторов и ассоциативных антител будет несравненно прочнее, если антигены являются полимерами с повторяющимися идентичными последовательностями, так как связывание будет «поливалентным». Уровень ассоциативных антител, необходимый для индукции в опыте с полимером, будет на несколько порядков ниже, чем уровень, необходимый для индукции в опыте с мономером. Иными словами, при данном фактическом уровне рецепторов и ассоциативных антител эффективная концентрация значительно выше для полимеров, чем для мономеров. При постоянном генетическом фоне фактический уровень зависит от того, насколько «чужеродны» повторяющиеся субъединицы. У животного до иммунизации должен присутствовать значительно более высокий уровень ассоциативных антител, направленных против абсолютно чужеродных полимеров, например бактериальных продуктов ЛФ, ЛЛС или СТ, чем против полимеров, очень сходных со «своими», например (Т, Г)-А-Л или (Н, Г)-А-Л. Собственные полимеры, например миелин, коллаген или антиген тканевой совместимости, фактически не встречаются с ассоциативными антителами, так как на них поддерживается толерантность.

Теперь я могу обратиться к одному парадоксальному генетическому аспекту. Весьма чужеродные стабильные полимеры, например ПФ, поливинилпирролидон, α -1,3-декстран, в эксперименте, по-видимому, не требуют ассоциативного распознавания для индукции (так называемая тимуснезависимость). Далее они индуцируют устойчивый синтез IgM без перехода к другим классам. На основании этой корреляции был сделан вывод, что индуцированный синтез IgM также не зависит от тимуса. Вепасеггаф (1-я сессия), Katz и Вепасеггаф («Adv. Immunol.», 1972, v. 15, p. 2) изложили самую последнюю формулировку этого мнения. Все наши представления о том, как функционируют продукты Ig-локусов, зависят от трактовки термина «тимуснезависимость». Ввиду этого я хотел бы сделать ряд замечаний об этом понятии, прежде всего с точки зрения синтеза IgM, а затем общих проблем. Рекомендую читателю подробный анализ проблемы, предложенный Bretcher («Transplant. Rev.», 1972, v. 11, p. 218), и мое обсуждение методологии (Cell. Immunol., 1972, v. 5, p. 1).

Обратимся теперь к переходу от IgM к IgG, допустив, что единственным фактором является эффективный аффинитет рецепторов. Если аффинитет рецептора В-клетки, продуцирующей IgM для повторяющегося полимерного антигена, больше, чем В-клетки, продуцирующей IgG (вследствие поливалентного связывания), то уровень ассоциативных антител, требующийся для индукции образования IgM, будет меньше, чем для индукции образования IgG при оптимальной концентрации антигена. Чем прочнее связывание антигена с рецепторами, тем ниже уровень ассоциативных антител, необходимый для образования порогового числа индуцирующих комплексов РАгА из антигенчувствительной клетки. Следовательно, вначале, когда уровень ассоциативных антител низкий, индуцируются В-клетки, продуцирующие IgM, а В-клетки, продуцирующие IgG, будут индуцированы позднее, когда уровень ассоциативных антител повышается сверх какой-то критической величины. Эту ситуацию трудно анализировать подробно, так как все еще остается сомнение в том, происходит ли переключение от IgM к IgG на клеточном уровне. Казалось бы, этот вопрос решен доказательствами того, что антитела к IgM блокируют индукцию синтеза как

IgM, так и IgG, а антитела к IgG блокируют только индукцию синтеза IgG. Однако если Feldman, Marchalonis и Wagner правы в том, что ассоциативные антитела подобны IgM, то можно предложить другую трактовку этих опытов, а именно, что анти-IgM-сыворотка действует на уровне кооперации, например на t-клетки, и может блокировать индукцию синтеза антител классов IgM и IgG независимо от того, действует ли клеточный переключатель. Если последняя трактовка окажется правильной, то мы получим окончательное опровержение гипотезы о том, что индуцированный ответ IgM не зависит от тимуса. Однако вопрос о том, происходит ли переключение от IgM к IgG на клеточном уровне, остался бы открытым. Так или иначе, даже если действует клеточный переключатель, он важен только в ранних стадиях антигенной селекции иммунной системы (см. дискуссию к статье Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 191, p. 529). В дальнейшем, еще до стимуляции антигеном, должны присутствовать популяции В-клеток, продуцирующих IgM и IgG, специфические к любому тест-антигену. Для того чтобы пояснить свою мысль, предположу, что существуют две популяции В-клеток: одна из них проявляет рецепторы IgM, а другая — рецепторы IgG (или другого класса). Те же доводы можно отнести и к переключению на клеточном уровне, если принять допущение о сигналах, посылаемых В-клеткам.

Аффинитет ассоциативных антител к антигену должен быть равен или превышать аффинитет рецептора В-клетки, продуцирующей IgM для того, чтобы наступил переход от синтеза IgM к IgG. Если бы аффинитет ассоциативных антител к антигену был равен аффинитету рецептора IgG, имеющего более низкий аффинитет, а не рецептора IgM, имеющего более высокий аффинитет, то, очевидно, эти два класса клеток индуцировались бы примерно одновременно, при оптимальной концентрации антигенов. Решение о том, произойдет ли индукция, определяется взаимодействием при низком аффинитете.

В опытах с мономерными антигенами отношение индуцированных антител IgM и IgG значительно ниже, чем в опытах с полимерными (поливалентными) антигенами (Makela, Pasanen, Sarvas. — In.: Cell. Interactions and Receptor, Antibodies in Immune Responses. Academic Press. N. Y., 1971, p. 243; Makela, Koskimies, Pasanen. — «Progress Immunology». Academic Press. N. Y., 1971, v. 1, p. 655). Это понятно, так как в отсутствие поливалентного связывания рецепторами на антигенчувствительных клетках индукция В-клеток, продуцирующих IgM или IgG, будет зависеть от константы связывания рецептора к детерминанте на антигене. Эффективная концентрация ассоциативных антител одинакова для обоих классов. В тех случаях, для которых установлено, что рецепторы IgG имеют более высокую константу связывания, чем рецепторы IgM, по-видимому, если в прошлом переключение происходило на клеточном уровне, то в дальнейшем соматическая селекция отобрала В-клетки, продуцирующие IgG, для того чтобы лучше отвечать на большой диапазон встречающихся в природе антигенов.

Если количество ассоциативных антител поддерживается на устойчивом уровне, ниже уровня, требуемого для индукции IgG, но достаточно высоко для индукции IgM, то наблюдается устойчивое состояние синтеза IgM. В отсутствие подавления антителами IgG по принципу обратной связи темпы индукции синтеза IgM будут пропорциональны эффективному уровню ассоциативных антител. Такая ситуация возникает в опыте с таким полимером, как α -1,3-декстран, если, например, антитела IgM, продуцируемые при индукции, подавляли бы индукцию ассоциативных антител, например, вступая в реакцию с антигеном и снижая его эффективную концентрацию.

а) **Опыты Grumet.** Попробуем применить эту трактовку к контролируемому Ig-1 ответу на (Т, Г)-А--Л, объяснив, во-первых, почему индукция ассоциативных антител повышает уровень у сильно реагирующих животных за порог, допускающий переключение к синтезу IgG, и, во-вторых, почему индукция ассоциативных антител достигает устойчивого состояния у слабо отвечающих животных более низкого, чем требуется для переключения.

Я несколько упрощу опыты Grumet («J. Exp. Med.», 1972, v. 135, p. 110) (1-я сессия), чтобы подчеркнуть основные моменты, которые становятся понятными в свете модели ассоциативного распознавания.

Во-первых, при избранной низкой концентрации антигена у конгенных животных с сильным и слабым ответом начинается только синтез IgM. В этом смысле они ведут себя одинаково. Вероятность образования индуцирующего комплекса РАгА на антигенчувствительной клетке при данной эффективной концентрации ассоциативных антител будет зависеть от K_p . При низкой концентрации антигена у сильно отвечающего животного можно индуцировать только В-клетки, продуцирующие IgM, так как темпы индукции ассоциативных антител лимитируются антигеном и последующее подавление антителами IgM по принципу обратной связи устанавливает кратковременное устойчивое состояние на уровне ниже, чем требуется для индукции В-клеток, вырабатывающих IgG. Избранная низкая концентрация антигена все же достаточно высока, чтобы индуцировать ответ у слабо отвечающих животных, имеющих некоторое количество ассоциативных антител, хотя и с более низким аффинитетом или на меньшем уровне, так как полигамное связывание повышает эффективный уровень сверх порога индукции. Очевидно, если бы концентрация антигена была достаточно низкой, то сильно отвечающие животные вырабатывали бы антитела IgM в количестве, достаточном для обнаружения, а слабо отвечающие животные не вырабатывали бы антител IgM, поддающихся определению. Для перехода требуется относительно высокий уровень ассоциативных антител и ниже этого уровня избранные концентрации антигена, не допускающие переключения у сильно отвечающего животного, все же могут индуцировать синтез IgM у слабо отвечающего. Я хочу подчеркнуть, что, если бы тесты на антитела IgM против (Т, Г)-А--Л были достаточно точны и действительно показательны для типов индукции, то мы обнаружили бы разницу между сильно и слабо отвечающими животными даже по ответу IgM.

Во-вторых, при избранной промежуточной концентрации антигена, как и следовало ожидать, синтез IgM начинается как у сильно, так и у слабо отвечающих животных. Однако сильно отвечающие животные переходят к синтезу IgG при промежуточных темпах синтеза, а у слабо отвечающих устанавливается устойчивое состояние с максимальными темпами синтеза IgM. Переход у сильно отвечающего животного означает просто, что индуцированный уровень ассоциативных антител повысился сверх порога, требуемого для индукции В-клеток, вырабатывающих IgG. Мы допускаем, что у слабо отвечающих животных установился устойчивый уровень ассоциативных антител, так как темпы синтеза IgM пропорциональны эффективному уровню ассоциативных антител, как я уже говорил. Устойчивое состояние достигается потому, что обратная связь подавляет индукцию ассоциативных антител, как я уже отмечал, рассматривая ответ на α -1,3-декстран.

Grumet (1-я сессия) представил нам доказательства того, что у слабо отвечающих животных плазма содержит какой-то неопознанный супрессорный фактор. Если этот фактор индуцируется и специфичен для (Т, Г)-А--Л, то он может представлять собой только антитела класса IgM. Так как антитела класса IgM подавляют ответ по принципу обратной связи также

у сильно отвечающего животного, то почему же они устанавливают устойчивый уровень ассоциативных антител настолько выше, что начинается синтез антител IgG, и этот последний класс антител становится медиатором контроля с помощью обратной связи, но на новом более высоком уровне? Если бы один аллель Ig-1 кодировал рецептор с высоким аффинитетом к (Т, Г)-А--Л, а другой кодировал рецептор с низким аффинитетом, то начальные темпы индукции в первом случае были бы высокими, а в последнем случае — низкими.

В-третьих, при избранной высокой концентрации антигена синтез IgM начинается как у слабо, так и у сильно отвечающих животных. Сильно отвечающее животное переходит к максимальному синтезу IgG, а у слабо отвечающего животного наблюдается устойчивый уровень синтеза IgM, значительно сниженный по сравнению с синтезом при иммунизации промежуточными концентрациями антигена. Этот последний эффект, очевидно, объясняется тем, что у слабо отвечающих животных достигается значительная степень иммунопаралича и, таким образом, скорость индукции уменьшается. Чем ниже первоначальная эффективная концентрация ассоциативных антител, тем больше склонность системы к параличу при конкуренции между индукцией и параличом, которая в этом случае наиболее очевидна при высоких концентрациях антигена. Я подчеркиваю, что различаю подавление по принципу обратной связи через посредство индуцированных эффекторных антител IgM и паралич через посредство взаимодействия рецептора и антигена (сигнал 1, рис. 82 и 83).

б) Соматическая селекция на уровне t-клеток. Следовало бы ожидать, что соматические мутации и селекция антигеном на уровне t-клеток повысили бы эффективный уровень ассоциативных антител настолько, что различие в ответах исчезло бы. Это было бы аналогично тому, что происходит на уровне В-клеток; примером служит ответ на α -1,3-декстран. Есть основания полагать, что это действительно происходит. После повторных инъекций низких доз (Т, Г)-А--Л (0,1 мкг) сильно отвечающее животное переходит к другому классу антител через 30 дней, а у слабо отвечающего животного переключение начинается через 45 дней. К сожалению, опыт продолжался недостаточно долго, так как именно в условиях низкой концентрации антигена действие селекции у слабо отвечающих животных было бы наиболее заметно. При низких концентрациях антигена, которые все же вызывают индукцию, селекционные силы, повышающие аффинитет ассоциативных антител, достигают максимума, и у слабо отвечающих животных со временем может произойти переключение. Когда это происходит, то слабо отвечающее животное должно вести себя так же, как стимулированное сильно отвечающее животное. При высоких концентрациях (Т, Г)-А--Л t-клетки низкого аффинитета у слабо отвечающих животных могут быть индуцированы к синтезу ассоциативных антител и, таким образом, не существует селекционного воздействия для взаимодействия с высоким аффинитетом. В этих условиях устойчивый эффективный уровень поддерживается с помощью обратной связи у слабо отвечающих линий, причем этот уровень ниже, чем требуется для переключения к синтезу IgG. Эта ситуация аналогична гетерогенному тотальному ответу на уровне В-клеток, когда не существует воздействия селекции, стремящейся усилить ответ на какую-то одну детерминанту, например (Ф, Г)-Про--Л у мышей или ГАТ у морских свинок.

в) Переключение от IgM к IgG является тимусзависимым. Из моего анализа опыта Grumet вытекает причина, по которой я не согласен с его выводом, что локус Ig-1 действует только на уровне переключения от IgM к IgG, т. е. что у слабо отвечающих животных имеется дефект индукции син-

теза IgG, контролируемый Ig-1. Это означает, как я отмечал выше, что продукты гена Ig-1 не требуются для индукции синтеза IgM. Предполагается, что индукция синтеза IgM не зависит от тимуса (раздел V, Б, 2). Это мнение не объясняет ответа по принципу «все или ничего» на ГАТ у мышей (Венасеггаф, 1-я сессия). С точки зрения модели ассоциативного распознавания ГАТ скорее похож на мономер, так как он является случайным кополимером в отличие от (Т, Г)-А--Л, в котором повторяется идентичная субъединица. Аллель Ig-1, контролирующей низкий уровень или аффинитет ассоциативных антител, дает резко выраженный эффект, если антиген является мономером, т. е. ответ по принципу «все или ничего». Если тест-антиген является обычным, повторяющимся полимером, подобно (Т, Г)-А--Л, то все еще может действовать поливалентное связывание, которое отчасти корригирует дефектность гена и допускает начальный ответ IgM. Такая же ситуация возникает, если пользоваться лимитирующими концентрациями такого мономера, как БСА. Выявляются небольшие различия аффинитета ассоциативных антител, которые обусловлены полиморфизмом Ig-1. Таким образом, из опытов с (Т, Г)-А--Л и ГАТ мы видим, что полиморфизм генов Ig-1 влияет на ответ IgM. Обычное мнение, основанное на «отрицательных» опытах, что ассоциативное распознавание не требуется для индукции синтеза IgM, является еще одним примером, когда факт может ввести в заблуждение из-за отсутствия теории (см. также раздел V, Б, 2).

г) **Размышления о рецепторах.** Необходимо добавить о механизме, который предполагается этой формулировкой. Uhr и Marchalonis получили указание о том, что рецептор IgM на В-клетках и рецептор ассоциативных антител, подобных IgM на t-клетках, мономеры (8S), а не пентамеры (19S). Допустим, что это правильно и относится ко всем остальным иммуноглобулиновым рецепторам на В-клетках, т. е. IgG, IgA и т. д. После введения иммуногена индукция происходит в следующем порядке: вначале t-клетки, затем В-клетки, вырабатывающие IgG, затем В-клетки, вырабатывающие IgG (или другой класс) (Cunningham, Sercarz. — «Eur. J. Immunol.», 1971, v. 1, p. 413). Как я уже указывал ранее, порядок зависит от двух факторов:

во-первых, имеется эффективный уровень ассоциативных и рецепторных антител. Этот уровень в основном зависит от того, насколько легко происходит полигамное связывание с антигеном;

во-вторых, антигенчувствительные клетки обладают чувствительностью к сигналам 1 и 2. Если рецепторы мономеры, т. е. не связаны ковалентно на поверхности клеток, то возможность полигамного связывания с антигеном зависит от их топологического расположения или подвижности в мембране. Топологическое расположение означает либо, что рецепторы дополняют друг друга, либо, что они комплексованы с комплементирующей субъединицей в мембране.

Если правильно мнение, что t-клетки и В-клетки, вырабатывающие IgM, индуцируются предпочтительно В-клеткам, продуцирующим IgG на данном уровне полимерного антигена или ассоциативных антител, так как полигамная связь с рецепторами t- или В-клеток, вырабатывающих IgM, образуется легче, чем полигамная связь на В-клетках, продуцирующих IgG, то тот же довод может быть отнесен и к параличу. Взаимодействие с рецептором на антигенчувствительной клетке является сигналом 1 паралича, поэтому в отсутствие ассоциативных антител следует ожидать более быстрых темпов паралича t- и В-клеток, вырабатывающих IgM при низкой концентрации полимерного антигена. Это не зависит от асимметрии отношений между t- и В-клетками. Даже если бы темпы паралича были одина-

ковы во всех клетках t и B , то обычные опыты оставили бы впечатление, что t -клетка по своей природе более чувствительна к параличу. Большая чувствительность t -клеток к параличу доказывается на основании экспериментальных данных, причем последствия асимметрии не учитываются (см. дискуссию в работе Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 529; Bretscher. — «Transplant. Rev.», 1972, v. 11, p. 218).

Поскольку мономерные антигены могут парализовать, сигнал 1 должен быть следствием изменения конформации рецептора при взаимодействии с антигеном через связывающий центр.

Это изменение может быть воспринято клеткой посредством нескольких механизмов. Ясно, что изменение конформации должно повлиять на вариабельную область, поэтому можно постулировать, что клетка имеет единицу, воспринимающую взаимодействие, которая комплементируется с постоянным участком варибельной области. Это допущение означает, что все V -подгруппы, кодируемые данным локусом, имеют какую-то общую четвертичную конфигурацию, подвергаемую конформационному изменению, которое прочитывается клеткой. На современном уровне наших познаний возможно также, что сигнал, возникающий при взаимодействии рецепторов с антигеном, переходит из варибельной области в другие области молекулы рецептора, а оттуда — в клетку. Конечно, это огорчает теоретиков, занятых изучением областей, так как означает, что области взаимодействуют друг с другом, а не являются просто бусами на нитке. Исследования структуры решат этот вопрос.

Другой механизм восприятия взаимодействия рецепторов с антигеном опосредован образованием решетки. Все известные эффекторные функции опосредованы образованием решетки или агрегацией иммуноглобулина, например, лизис комплемента или выброс гистамина (см. обсуждение: Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, N 90, p. 529). Следовательно, мы могли бы продолжить свое предположение и считать, что изменение конформации в варибельной области после взаимодействия через средство активного центра ведет к агрегации, которая в свою очередь воспринимается системой (аденилциклаза?), передающей сигнал 1. Я не решаюсь поставить знак равенства между этим постулируемым индуцированным лигандом изменением конформации, ведущим к агрегации, и зримым образованием бляшки (не колпачка) рецепторов после добавления меченого флюоресцирующей краской антииммуноглобулина к B -клеткам (Raff, 4-я сессия). Однако, если действительно поставить такой знак равенства, то можно высказать два очень важных предположения:

— Образование бляшки происходит при специфическом связывании моновалентного лиганда с B -клетками через средство связывающего участка рецептора (постулируемый сигнал 1).

— Бивалентный иммуноглобулин против идиотипа (или даже против Fab) посылает сигнал 1, который при наличии сигнала 2 (анормальная индукция, раздел VI) ведет к индукции B -клетки. Моновалентный Fab-фрагмент антител против идиотипа не может ни парализовать, ни индуцировать.

Б. Диапазон, степень и словарь специфичностей рецепторов t - и B -клеток

Далее мы должны остановиться на другом свойстве рецептора, кодируемого $Ig-1$, а именно на селекционных воздействиях, детерминирующих его специфичность. Следует ли ожидать различий по диапазону или по степени специфичностей, распознаваемых популяциями t - или B -клеток? Следует ли

ожидать различного словаря специфичностей? Мне нравится этот термин: «словарь специфичностей», предложенный Benacerraf и McDevitt, так как он позволяет провести четкую грань между диапазоном, степенью и словарем специфичностей. В настоящее время считается, что диапазон и степень специфичности, которые могут распознаваться популяциями t- и B-клеток, весьма различны (см., например: Gally, Edelman. — «Ann. Rev. Genetics», 1972, v. 6, p. 1). Почему это маловероятно? Основная селекционная сила, увеличивающая степень специфичности, — это различение «своего» и «чужого». Диапазон и степень специфичности — это противоположные свойства молекулы. Низкая степень специфичности означает широкий диапазон потенции распознавания данным рецептором. Контрселекционное воздействие заключается в том, что, чем выше степень специфичности, тем больше антител требуется для покрытия диапазона распознавания, чтобы иммунная система могла предвосхитить большое разнообразие антигенов. Следовательно, фактическая степень специфичности антительной молекулы, которую мы наблюдаем сейчас, является итогом этих двух противодействующих сил селекции. Этот довод относится к любой части иммунной системы, которая должна различать «свое» и «чужое» независимо от того, выполняет ли она эффекторные функции или функции ассоциативного распознавания. Функционирующая иммунная система должна как минимум обладать степенью специфичности в популяциях t- и B-клеток так, чтобы она могла различать «свое» и «чужое», и диапазоном специфичности, достаточно широким, чтобы распознавать минимум один детерминант на случайном антигене. Мы знаем, что это означает для популяции B-клеток, так как степень специфичности (перекрестная реакция) и диапазон специфичности («от супа до орехов») сывороточных антител изучаются уже 50 лет. Минимальные требования для рецепторов t-клеток такие же, как и для рецепторов B-клеток.

Конечно, любая иммунная система, удовлетворяющая минимальным требованиям диапазона и степени специфичности в t- и B-клетках, будет действовать эффективно, если число специфичностей B-клеток $Ч_B$ будет значительно меньше, чем число специфичностей t-клеток $Ч_T$, т. е. $Ч_B \ll \ll \ll Ч_T$. Избыточное $Ч_T$ допустит различение «своего» и «чужого» и максимальное использование специфичности $Ч_B$. Однако есть предел, сверх которого данная специфичность в избыточном $Ч_T$ была бы лишней на уровне антигена, имеющего много детерминантов, и селекционной силы, поддерживающей ее, не было бы или она была бы отрицательной. Если бы, с другой стороны, $Ч_B \gg \gg \gg Ч_T$, то возникла бы симметричная ситуация без селекционного воздействия, поддерживающего избыточные специфичности $Ч_B$. Дело в том, что минимальное требование означает сложную степень и диапазон специфичностей в обеих популяциях клеток, и не существует селекционного воздействия, которое стремилось бы к большому перевесу той или другой популяции, т. е. $Ч_B \gg \gg \gg Ч_T$ или $Ч_T \gg \gg \gg Ч_B$. Безусловно, широко распространенное мнение, что t-клетки имеют низкую степень специфичности («примитивные», а не «первичные»), не учитывает селекционные воздействия различения «своего» и «чужого».

Необходимо рассмотреть еще один фактор. Индукция t-клеток, как и B-клеток, требует ассоциативного распознавания антигена через посредство рецептора на t-клетках и ассоциативных антител, поэтому специфичность этого класса к самоиндукции, очевидно, должна иметь ту же степень, как и класса B-клеток. Животное ничего не выиграет, если его рецепторные антитела будут иметь высокий аффинитет (высокую степень специфичности), а ассоциативные антитела — низкий аффинитет (низкую степень спе-

цифичности) или наоборот. Вероятность индуктивного конфликта зависит от геометрического среднего продукта двух аффинитетов K_A и K_R рецептора и ассоциативных антител к антигену.

Однако, говоря формально, словарь специфичностей может быть различным. Рецепторы В- или t-клеток могут иметь одинаковый диапазон специфичностей, одну и ту же степень специфичности (среднюю константу связывания), но если взять крайний пример, не совпадающий словарь. Допустим, что случайная половина слов в словаре относится к категории В-клеток, а вторая половина — к категории t-клеток. Поскольку рецептор t-клеток, кодируемый отчасти Ig-1, отличается как минимум на тяжелую цепь (V_H^T), то словарь должен быть различен. Конечно, маловероятно, что этот словарь совсем не совпадает (крайний случай). Скорее имеется значительное совпадение, так как наиболее важные антигены, имеющие значение для выживаемости, являются повторяющимися полимерами. Тот факт, что рецепторы t- и В-клеток являются разными молекулами, ведет к неясности в отношении словаря специфичностей. Если бы можно было отдельно исследовать рецепторы t- и В-клеток, связывающие какой-либо экспериментально найденный детерминант, то удалось бы заметить различие. Например, существует много различных переменных областей иммуноглобулинов, которые имеют активность анти-ДНФ с примерно одинаковой константой связывания. Здесь нас интересует функция эффективного «распознавания» детерминантов, а не различия в последовательности распознающих их антител.

Это второе замечание относительно степени, диапазона и словаря специфичностей может быть пояснено другой аналогией. У коров практически единственным классом легких цепей является ламбда, тогда как у мышей проявляется почти исключительно каппа. У человека оба класса проявляются примерно поровну. Однако мы не делаем отсюда вывода, что диапазон и степень специфичности коровьего иммуноглобулина иные, чем у мышей. Аргумент ввиду различных последовательностей ламбда и каппа V-области мы знаем, что словарь специфичностей, распознаваемый клетками коровы и мыши, различен. Однако словарь распознаваемых детерминантов селекционируется на уровне антигенов, и оба животных находятся в одинаково благоприятном положении, если одно из них распознает N-ацетилгалактозаминовые, а другое — фосфорилхолиновые детерминанты антигена С-углевода. Ту же аналогию можно провести, сравнивая регионы тяжелых цепей V_H у 2 животных, например у кроликов и мышей, или даже аллельные V_H регионы у слабо и сильно отвечающих животных к данному антигену. Диапазон и степень специфичности в популяциях t- и В-клеток должны быть примерно одинаковы для оптимальной функции иммунной системы. Словари могут быть различны.

1. $IR-V_V^T$ ПРОЯВЛЯЕТ АЛЛЕЛЬНОЕ ИСКЛЮЧЕНИЕ

На основании того, что сказано о специфичностях, можно предсказать, что проявление Ig-1 будет характеризоваться аллельным исключением. Как ни странно, намек на то, что это предположение справедливо, был высказан на нашей конференции в виде очень важного опыта, описанного Green (1-я сессия).

Антигеном служили лимфоциты морских свинок: у инбредных линий 2 и 13 были получены две антисыворотки: у линии 2 против линии 13 и у линии 13 против линии 2. Эти линии различаются по отвечаемости на несколько антигенов, контролируемых аллелями в локусе, который у морских свинок аналогичен локусу Ig-1. Я хочу отметить здесь, что у гибридов

(2×13)F₁ антисыворотка 2 против 13 блокирует отвечаемость, контролируруемую Iг-аллелем линии 13, но допускает проявление Iг-аллеля линии 2, тогда как антисыворотка 13 против 2 действует противоположным образом. Green и Venesegga предложили объяснение, что антисыворотка прямо или косвенно блокирует распознавание антигена рецепторами t-клеток. Я согласен с этим объяснением, но оно слишком неопределенное, и мне хотелось бы обсудить здесь механизм. Допущу, что морская свинка и мышь имеют одну и ту же структуру, содержащую Iг-локус, сцепленный с основным комплексом гистосовместимости, и буду говорить об этом опыте с морскими свинками, пользуясь номенклатурой, созданной для мышей.

Прежде всего скажу, почему я не считаю, что здесь играют роль детерминанты H-2 на K и D. Имеющиеся данные (Cullen, Schwartz, Nathenson, Cherry. — «Proc. Nat. Acad. Sci.», 1972, v. 69, p. 1394; Cullen, Schwartz, Nathenson. — «J. Immunol.», 1972, v. 108, p. 596) позволяют допустить, что K и D являются одиночными цистронами, кодирующими одиночные полипептидные цепи, которые не соединены друг с другом ковалентно. Например, при обсуждении этого вопроса на 4-й сессии Lilly представил доказательства того, что можно создать «колпачок» K и оставить D равномерно распределенным на поверхности клетки и наоборот. Если допустить, что это сами рецепторы t-клеток, то возникает неудобная ситуация: поскольку все антигенчувствительные клетки B и t проявляют аллели K и D, то каждая клетка должна бы проявить одни и те же четыре рецепторные специфичности плюс по крайней мере один свой рецептор, кодируемый Iг-1.

Однако еще более важно, что антигенчувствительная клетка гибрида F-1, проявляющая продукты аллелей K и D, не сможет распознать, что именно реагирует с антисывороткой, если не добавить допущение Green (1-я сессия), а именно, что K и D являются частью структур рецептора и модулируют ее. Это исключено, так как потребовало бы, чтобы каждый аллельный продукт K и D взаимодополнял бы рецептор, кодируемый локусом Iг-1 на той же хромосоме, т. е. взаимодействие происходило бы только в цисположении. Следовательно, белки K и D не могут быть частью рецепторов t-клеток, поскольку они блокируются сывороткой 13 против 2 и сывороткой 2 против 13. Если обе сыворотки — 13 против 2 и 2 против 13 направлены против самого рецептора t-клеток, то распознаваемый детерминант на этом рецепторе создается аллельной полиморфной разницей, кодируемой Iг-1 в результате замещения аминокислот. Эти замещения определяют также связывающие специфичности зародышевой линии, кодируемые рецептором. Если рецептор является иммуноглобулином, то мы могли бы считать, что эти антисыворотки распознают либо идиотипические детерминанты и действуют, как описано ранее (3-я сессия) при ответах на α-1,3-декстран и С-углевод (фосфорилхолин), или аллотипические детерминанты в регионах V или С подобны найденным у кроликов. Результаты, полученные с гибридом (2×13)F₁, показывают, что проявление отвечаемости можно разделить путем селективного подавления аллельных продуктов. С моей точки зрения, наиболее вероятно, что локус Iг-1 характеризуется аллельным исключением и клональным проявлением. Конечно, если бы мы имели дело с рецепторами B-клеток, например, рецепторами, определяющими отвечаемость к фосфорилхолину, и доказали бы, что антиидиотипические или антиаллотипические сыворотки специфично блокируют антительный ответ, детерминируемый тем или другим аллелем у гибридов F₁, то мы предположили бы со значительной долей уверенности действие аллельного исключения и клонального проявления (см. также Cosenza, Kohler. — «Science»,

1972, v. 176, p. 1027; Hart, Wang, Pawlak, Nisonoff. — «J. Exp. Med.», 1972, v. 135, p. 1293).

Однако в опыте Green блокирование является неадекватным тестом гипотезы аллельного исключения. Важным доказательством была бы опосредованная комплементом цитотоксичность, приводящая к умерщвлению клеточек, проявляющих тот или другой аллель. К сожалению, такой тест не может быть поставлен, если антисыворотки не будут абсорбированы, чтобы избежать их от активности против гистосовместимости.

В принципе Green с соавт. (раздел IV, Б) располагают реагентами для анализа Ig-1 локуса у кур подобно реагентам Green для морских свинок. Они могут также искать аллельного исключения в проявлении рецепторных рецепторов, поэтому было бы весьма интересно, если бы он доказал аллельное исключение в проявлении Ig-1.

В эксперименте имеются только намеки на то, что Ig-1 характеризуется аллельным исключением. В основном поэтому я подошел к данной проблеме раньше с общей точки зрения и задал вопрос о том, какие селекционные силы детерминируют различие «своего» и «чужого». Если антигенчувствительная клетка проявляет рецепторы многих различных специфичностей и при индукции все они усиливаются, то итог был бы таким же, как образование антител с низкой степенью специфичности. Таким образом, селекционные силы, ведущие к аллельному исключению, такие же, как и силы, упомянутые мною выше, способствующие специфичности антител, т. е. различению «своего» и «чужого» (более подробное обсуждение см: Bretscher, Cohn. — «Science», 1970, v. 169, p. 1042; Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 529; Cohn. — «Cellul. Immunol.», 1972, v. 5, p. 1).

Хочу напомнить вам также, как важно доказать в эксперименте, что аллельное исключение действует на локус Ig-1. Цистроны H-2 K и D не проявляют аллельного исключения, следовательно, поскольку оба аллельных продукта присутствуют на антигенчувствительных клетках, все модели типа Gally—Ohno, в которых цельные хромосомы или части хромосом были бы перестроены так, чтобы превратить гетерозигот в гомозиготы, исключены. Очевидно, мы должны обратиться к регуляторным механизмам, действующим на уровне гена (Cohn, Symp. — «Inter. Soc. Cell. Biol.», 1969, v. 7, p. 1.)

2. ТИМУСНЕЗАВИСИМОСТЬ НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ОСНОВНЫМ РАЗЛИЧИЕМ

Теперь мы можем подойти к основному разногласию между нами. Как следует толковать так называемые тимуснезависимые антигены? Существует ли класс ответов, для которых не требуется продукт Ig-1-гена, ассоциативные антитела? Я хочу рассмотреть эту проблему в той специфической форме, под которой она скрывается здесь, и оставлю общее обсуждение для работы Bretscher («Transplant. Rev.», 1972, v. 11, p. 218). Мы должны попытаться создать концепцию иммунной системы, которая шла бы дальше фактов, чтобы факты не ввели нас в заблуждение. В 30-х годах был сделан вывод, что ферменты не являются белками, так как каталитическую активность можно было измерить в отсутствие выявляемого белка. Теперь мы приходим к выводу, что ассоциативное распознавание не обязательно для индукции, так как мы можем измерить активность индуцированных эффекторных антител без поддающихся выявлению ассоциативных антител (функция кооперации).

По вопросу о тимусзависимости и независимости, т. е. о роли ассоциативного распознавания, существует три точки зрения.

— Ответ на все антигены в принципе зависит от тимуса, так как ассоциативное распознавание обязательно для индукции, но не для паралича. Это модель ассоциативного распознавания, разработанная мною и Bretscher.

— Ответ на все антигены в принципе не зависит от тимуса, ибо существует пока еще неизвестный механизм различения «своего» и «чужого». Ассоциативное распознавание — это хелперный прием, наклонившийся на неизвестный механизм. Такова позиция Mitchison, Möller, Miller.

— Ответ на некоторые антигены относится к первой категории и в принципе зависит от тимуса, а на другие — ко второй категории и в принципе не зависит от тимуса. Это позиция Venasagraf, Grumet, Sela.

Роль локуса Ig-1 в регуляции выбора между индукцией и параличом не может быть проанализирована с точки зрения Mitchison, Möller, Miller, так как она заключается в отрицании модели ассоциативного распознавания. И только в этом. Она не говорит нам, как делается выбор между индукцией и параличом. В этом смысле данную позицию нельзя назвать теорией. Они должны предложить нам теорию, которая могла бы конкурировать с нашей.

Katz и Venasagraf («Adv. Immunol.», 1972, v. 15, p. 2) признают какую-то неопределенную форму модели ассоциативного распознавания для тимуснезависимых антигенов, но у них нет модели для тимуснезависимых антигенов. Следовательно, они вынуждены просто повторять факты или буквально толковать без обобщений эксперименты, определяющие тимуснезависимость, вместо того, чтобы экстраполировать ту форму модели ассоциативного распознавания, которую они действительно признают, от тимусзависимых к тимуснезависимым антигенам. Если существует один центральный механизм различения «своего» и «чужого», то их точка зрения противоречива. Если действительно имеется два механизма, то необходим анализ обоих, а не буквальное описание опытов. Данная позиция была высказана здесь в различных формулировках. Следует напомнить их, прежде чем перейти к так называемой тимуснезависимости с точки зрения модели ассоциативного распознавания.

Venasagraf (1-я сессия) истолковал мои замечания так, будто я полагаю, что все антигенные детерминанты могут одинаково успешно действовать как «гаптены» и как «носители». Это недоразумение, так как из общего характера анализируемой мной теории вытекает, что я согласен с ними и что словарь специфичностей, проявляемый t- и B-клетками, в принципе различается просто вследствие допущения, что их рецепторы отчасти кодируются разными локусами $Ig-V_H^T$ и $Ig-V_H^B$. Ясно, что для данного детерминанта на иммуногене ответ в классе эффекторных или ассоциативных антител зависит от количества клеток и от аффинитета их рецепторов по сравнению с рецепторами, направленными против других детерминантов. Такова была основа моего анализа специфической доминантной отвечаемости. Недоразумение обусловлено нашими жаргонными терминами: «гаптены» и «носители», поэтому постулат, который мог бы быть интересным (хотя я его и не сделал), лишается смысла. Я сознательно избегал пока этих терминов. С моей точки зрения, гаптен — это не иммуногенная молекула, которая при сопряжении с иммуногенной молекулой (носителем) направляет индукцию антител, дополняющих его.

Venasagraf дает новые определения этих терминов в своем выборе экспериментальных доказательств гипотезы: данные детерминанты «не могут функционировать одинаково в качестве гаптенов и в качестве носителей». Он замечает, что «полисахариды и D-аминокислоты, например, адекватны как гаптенотетерминанты, но не могут функционировать как детерми-

нанты-носители». Таким образом, Вепасеггаф по существу определяет два типа детерминантов на иммуногенной молекуле. «Гаптен» — это детерминант, против которого можно измерить титр индуцированных эффекторных антител, но не ассоциативных антител (кооперативная активность), а «но-рованные ассоциативные антитела (кооперативная активность), так же как и эффекторные антитела. Таким образом, тимуснезависимые антигены, например полисахариды и D-аминокислотные полимеры, действуют как гаптены в том смысле слова, какой придает этому термину Вепасеггаф, т. е. они индуцируют образование эффекторных антител (ответ В-клеток), но, насколько известно, не индуцируют ассоциативных антител (кооперативная активность). На основании этого Вепасеггаф (4-я сессия) заключает, что гаптеновые детерминанты распознаются только В-клетками, но не t-клетками. По его собственным словам, «можно сделать без риска еще одно обобщение, что некоторые типы молекул не стимулируют тимоциты. Это так называемые тимуснезависимые антигены, например, наиболее сложные полисахариды». Эту позицию (далеко не лишенную риска), было бы трудно защищать, если бы не тот факт, что тимуснезависимые антигены индуцируют синтез IgM. Дело в том, что В-клетка, взаимодействующая с таким детерминантом, не может определить, находится ли этот детерминант на тимусзависимом или тимуснезависимом антигене (т. е. распознан ли на этом антигене другой детерминант ассоциативными антителами t-клетки), если не получит какого-то сигнала. Следовательно, можно допустить, что В-клетка, взаимодействующая с каким-либо тимусзависимым или независимым антигеном, индуцируется к образованию антител IgM в отсутствие ассоциативных антител, но в их присутствии переключается на IgG. Напоминаю, что сигнал, ведущий к синтезу IgM, в этой модели является тем сигналом, который, по нашему предположению, ведет к параличу (модель ассоциативного распознавания, рис. 82). Следовательно, эта формулировка неудовлетворительна, так как она игнорирует то, как регулируется различие «своего» и «чужого» при индукции антител IgM любым типом антигена, тимусзависимым или тимуснезависимым. На мой взгляд, это пробел в концепции, который перед лицом общей теории заставляет подозревать такие факты, как тимуснезависимость. Для Вепасеггаф (4-я сессия) требование, чтобы теория объясняла индукцию и паралич как для тимусзависимых, так и для тимуснезависимых антигенов, является ненужным экстраполированием, идущим дальше «фактов». Возможны два подхода к тимуснезависимости: можно утверждать, либо что существует вторая особая линия клеток нетимусного происхождения (а костномозгового), обладающая всеми кооперативными свойствами, которые я приписываю t-клетке, либо что антигены, рассматриваемые как тимуснезависимые, имеют общее структурное свойство, позволяющее им быть иммуногенами на уровне ассоциативных антител ниже, чем уровень, определяемый существующими методами. То или другое предположение можно избрать, основываясь на соображениях вероятности.

Первое предположение означает, что словарь специфичностей двух предпологаемых кооперирующих линий клеток различен, т. е. рецепторы кодируются какими-то еще неизвестными локусами генов, и вообще мы должны вновь изобрести t-клетку. Затем странно то, что все антигены по свойствам тимуснезависимости должны быть повторяющимися полимерами с очень чужеродными субъединицами. Если бы действовали две различные кооперирующиеся линии клеток, то нет оснований к тому, что тимуснезависимые антигены были бы полимерными. Следовательно, я считаю, что это предположение очень маловероятно.

Согласно второму предположению полимерные антигены с очень чужеродными субъединицами, по-видимому, не требуют ассоциативных антител для индукции лишь потому, что экспериментальные методики, снижающие уровень ассоциативных антител, фактически их не ликвидируют. Тот факт, что полисахариды, поливинилпирролидон ЛПС, ПФ и D-аминокислотные полимеры индуцируют животных, которые «хирургически» (тимэктомированные, облученные, восстановленные костным мозгом) или генетически (мутация «голых» мышей) «опустошены» от t-клеток, означает лишь, что эти антигены являются эффективными иммуногенами, и, таким образом, фактический уровень ассоциативных антител, допускающий индукцию этими антигенами, может быть очень низким. Это свойство, очевидно, должно быть присуще повторяющимся очень чужеродным полимерам. Хирургические и генетические вмешательства снижают количество ассоциативных антител, но еще не доказано, что они их ликвидируют. Просто невозможно прийти к выводу, как это делает Feldman в книге «Immunological Intervention» (Academic Press, N. Y., 1971, p. 74), что на ПФ можно «получить 100% нормальный ответ при полном отсутствии t-клеток». Следовательно, кажущаяся независимость от тимуса не может служить доказательством, что ассоциативные антитела не могут или не распознают тимуснезависимые антигены.

Согласно модели ассоциативного распознавания, контроль Ig-1 тимуснезависимых антигенов не выявлен в эксперименте потому, что вообще полиморфизмы не ведут к уровню ассоциативных антител по принципу «все или ничего». Следовательно, иммуногены, эффективные потому, что они являются полимерами и полигамно связываются с ассоциативными и рецепторными антителами, все же могут вызвать ответ IgM у слабо отвечающих животных. Если бы для тимуснезависимого антигена, определенного a рg10-g1, например, белка жгутиков, ПФ, был бы доказан контроль Ig-1, то мы просто назвали бы его тимусзависимым. Четкой грани между ними нет. Припоминаю, что недавно гемоцианин перешел из категории тимуснезависимых антигенов в категорию тимусзависимых только в результате пересмотра терминов.

Sela (4-я сессия) предложил другую гипотезу, различающую тимусзависимые и тимуснезависимые антигены. Он полагает, что первые распадаются и утрачиваются (подвергаются метаболизму), а вторые устойчивы и стабильны (не метаболизируются).

Конечно, скорость распада влияет на стойкость индукционного сигнала и на степень рассмотренного мною выше эффекта кругооборота ассоциативных антител, но безусловно, это вторичные соображения, которые надо отделить от основных. Из гипотезы Sela прежде всего следует, что роль продукта, кодируемого Ig-1, заключается в том, чтобы стабилизировать поддающиеся метаболизму тимусзависимые антигены так, чтобы они стали иммуногенами. Sela в действительности предполагает довольно плохоуловимую форму гипотезы ассоциативного распознавания для индукции тимусзависимыми антигенами. (Я не говорю сейчас о том, как трудно изобрести точный механизм стабилизации для того, чтобы сделать методическое замечание.) Стабилизированные тимусзависимые и тимуснезависимые антигены эквивалентны. Согласно этой модели тимуснезависимые антигены не нуждаются в ассоциативном распознавании (стабилизации) для индукции, и, таким образом, ясно, почему концепция Sela о тимусзависимости и независимости неполна. Он не анализирует сигнал, отличающий индукцию от паралича. При таком анализе становится ясно, что модель стабилизации неудовлетворительна, так как она не объясняет никаких аспектов различ-

ния «своего» и «чужого», например, зависимость развития толерантности от дозы, независимость от дозы поддержания толерантности, нарушение толерантности и т. д.

Причина, почему L-аминокислотные полимеры тимусзависимы, а D-аминокислотные полимеры, по-видимому, тимуснезависимы, состоит в том, что последние более чужеродны для животного и что эффективный уровень ассоциативных антител, предшествующий иммунизации, выше для D-полимеров, чем для L-полимеров. Другая причина заключается в том, что размеры молекул активного иммуногена могут быть меньше, если используются L-полимеры вследствие их распада перед встречей с иммунной системой. Важным примером для проверки правила Sela является полимер D-глутамил, который становится иммуногеном только при сопряжении с иммуногенным веществом. Однако этот гаптен может вызывать паралич (Roelants, Goodman. — «Nature», 1970, v. 227, p. 175). Таким образом, он может эффективно взаимодействовать с рецепторами В-клеток. D-глутаминовый полимер не иммуногенен, так как уровень ассоциативных антител, специфичный для него (функция t-клеток), слишком низок. Таким образом, для того чтобы стать независимым от тимуса, нужно не только, чтобы антиген был D-полимером (не метаболизирующимся?). Опять-таки общий вывод, что не метаболизирующиеся D-полимеры тимуснезависимы, а метаболизирующиеся L-полимеры тимусзависимые антигены, представляет собой еще один вводящий в заблуждение «факт», если отсутствует общая теория.

3. ПРОВЕДЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ НЕ ПОЗВОЛЯЮТ СДЕЛАТЬ ВЫВОДОВ О СЛОВАРЕ, ПРОЯВЛЯЕМОМ РЕЦЕПТОРАМИ t- И В-КЛЕТОК

Теперь должно быть ясно, почему вывод, подсказанный генетическими исследованиями (раздел II, В), о том, что t- и В-клетки проявляют рецепторы различной структуры (закодированы разными локусами), не может быть сделан на основании проведенных исследований специфичности (см. также раздел V, А, 1). Если бы эти исследования опровергли то, что словарь t- и В-клеток совпадает, у нас был бы довод, не зависящий от генетики, против того, что Ig-1 кодирует каппа-локус (конечно, если допустить, что нет добавочных неизвестных локусов, кодирующих рецептор t-клеток).

Прежде всего тесты на способность распознавания ассоциативных антител в общем неадекватны. Иммунизация адаптивно перенесенной взвесью тимусных клеток с детерминантом известной структуры, сцепленным молекулой Р, индуцирует образование ассоциативных антител к многим детерминантам на иммуногене НР. Характер появляющихся антител и их пропорции определяются многими уже рассмотренными генетическими и негенетическими факторами. Однако даже если бы ответ ассоциативных антител на детерминант Н был значительным, около 10% общего ответа, то в последующем тесте, основанном на кооперативной активности, он мог бы остаться незамеченным. Если бы антиген был НА, в котором А представляла собой чужеродную, но практически не иммуногенную молекулу, то индукция В-клеток против А путем кооперации с ассоциативными антигенами против Н могла бы остаться незамеченной, так как в тест-системе, по всей вероятности, могла быть тенденция к параличу. Тем не менее есть основания полагать, что ассоциативные антитела распознают детерминанты, содержащиеся ДНФ (Iverson. — «Cell. Interactions». Silvestri, ed. North-Holland Publishing Co. Amsterdam, 1972, p. 192).

Тимуснезависимые антигены могут не вызывать клеточных реакций по многим причинам, кроме настоящего мнения, которое я считаю неверным, а именно, что опосредованные клетками реакции являются функцией t-клеток эффекторов. Например, если тимуснезависимые антигены не «переходят» от IgM к классу иммуноглобулинов, опосредующему киллерную активность, то клеточная активность не будет выявлена. Возможно поэтому создается впечатление, что клеточные реакции, видимо, контролируются локусами Ig-1 по принципу «все или ничего», а не по принципу сильной или слабой отвечаемости в отличие от сывороточных антител (Венасеггаф, 1-я сессия, раздел V, А, 2). У слабо отвечающих животных просто нет переключения, и, таким образом, у слабо отвечающих линий класс антител, ответственный за клеточную активность, возможно, не индуцируется, так же как и класс IgG, для которого контролируемый Ig-1 ответ также подчиняется принципу «все или ничего» (раздел V, А, 4а). Я возражаю против всей концепции о том, что клеточные тесты определяют активность продукта гена Ig-1 более прямо, чем тесты на сывороточные антитела. Пока проще всего допустить, что Ig-1 кодирует исключительно ассоциативные антитела, имеющие только кооперативную функцию.

Таким образом, весьма распространенное мнение, что t-клетки проявляют «примитивные рецепторы», т. е. рецепторы с низкой степенью и узким диапазоном специфичности, основано на отсутствии примеров t-клеток, но не В-клеток, способных отвечать на антигенный детерминант. Обычно мы видим, что В-клетки могут отвечать, например, на ПЛЛ-(Т, Г)-А--Л и т. д., а t-клетки не отвечают или отвечают слабо. Это общее наблюдение ничего не говорит о свойствах самих рецепторов на двух популяциях клеток. Оно является неизбежным следствием известных тестов на индуцированные t-клеточные ассоциативные антитела, которые в конечном счете зависят от кооперации, ведущей к ответу В-клеток. При использовании существующих тест-систем в том виде, как они есть, вряд ли можно обнаружить отвечаемость t-клеток и неответчаемость В-клеток. Можно предсказать, что при правильных поисках будут найдены детерминанты, на которые отвечают t-клетки, но не В-клетки (см. раздел V, А, 2). Это отвергнет уже а priori маловероятное предположение, что рецепторы t-клеток «примитивны».

Я подчеркнул вначале, что различие между «своим» и «чужим» не может кодироваться генами зародышевой линии, а очевидно, приобретается. Поскольку этот процесс действует селекционно в сторону специфичности, маловероятно, что можно прийти к общему правилу о словаре специфичностей, рассматривая потенцию распознавания ассоциативных клеток по сравнению с эффекторными. Так или иначе следующие общие выводы (Венасеггаф, 1-я сессия; Katz, Venasaggaf. — «Adv. Immunol.», 1972, v. 15, p. 2): t-клетки, в отличие от В-клеток, совсем не распознают или распознают слабые синтетические детерминанты (ДНФ, арсенилат и т. д.) или детерминанты на полисахаридах, синтетических полимерах (поливинилпирролидон, D-аминокислоты) и некоторых белках, например, жгутиковой белке, и t-клетки специализированы к распознаванию нативных и измененных белков и полипептидов — все эти выводы нельзя сделать на основании данных о специфичности и в отсутствие общей теории нельзя считать, что они являются достоверными обобщениями.

Если постоянно выдвигаются такие формулировки, основанные на «фактах», то, очевидно, они имеют какую-то рациональную основу. Почему был избран локус Ig-1 так, что его продукт не распознает перечисленные выше детерминанты, тогда как локусы, кодирующие рецепторы В-клеток, были селекционированы к их распознаванию? Почему был выбран локус Ig-1 так,

что продукт его остается «примитивным», т. е. относится к рецепторам t-клеток, которые менее специфичны, чем рецепторы В-клеток? (Упапе, 4-я сессия; Gally, Edelman. — «Ann. Rev. Genetics», 1972, v. 6, p. 1).

В. Сцепление генов К и D, а также Ss и Slp с Ig-1 случайно

Несомненно, обсуждение этого тезиса должно быть сложным. Существует разница между двумя формулировками:

— если несколько генов взаимодействуют для того, чтобы прямо или косвенно повысить приспособляемость, то естественный отбор будет способствовать более тесному сцеплению между ними;

— если несколько генов тесно сцеплены, то, очевидно, это указывает на воздействие естественного отбора, так как они взаимодействуют, увеличивая приспособляемость.

Первое положение является доказанным принципом эволюции, а второе — просто интуитивное ощущение вероятности, которое подкрепится, если можно было бы предложить точный механизм взаимодействия. Важен термин «взаимодействие», так как он предполагает функциональное соотношение, хотя и не прямое. Интуитивное ощущение, связанное со второй формулировкой, глубоко повлияло на наши рассуждения. Эта интуиция нашла отражение в неопределенной мысли, что если два компонента вместе находятся на поверхности и кодируются сцепленными генами, то, очевидно, они «взаимодействуют, повышая приспособляемость». Пока что это интуитивное ощущение не привело к конкретным опытам или обобщениям по отношению к IX группе сцепления, поэтому я собираюсь внимательно рассмотреть его. Лocus Ig-1 является единственным Ig-локусом, контролирующим специфическую доминантную отвечаемость, для которого известны соотношения сцеплений с другими маркерами. Таким образом, на экспериментальном основании были бы не оправданы какие-либо общие выводы о соотношениях между Ig-локусами и локусами, сцепленными с гистосовместимостью. Карту региона составляют, начиная от центромеры (рис. 84).

Каждый из «генов» К, D, Ss и Slp, по-видимому, кодирует одну цепь полипептидов. Допустим, что это так (Cullen, Schwartz, Nathenson, Chegoy. — «Proc. Nat. Acad. Sci.», 1972, v. 69, p. 1394; Shreffler, Passmore. — «Proc. Symp. Immunogenetics of the H-2 system». Karger, Basel, 1971, p. 58). К и D являются исключительно белками, связанными с мембраной, Ss и Slp — секретированными сывороточными белками. Оба аллеля, К и D, проявляются на различном уровне в мембранах всех клеток, тогда как Ig-1 проявляется как рецептор только на t-клетках и, вероятно, характеризуется аллельным исключением. Почки, вероятно, синтезируют как Ss, так и Slp. Slp проявляется только у самцов, так как он индуцируется тестостероном. Таким образом, перед нами, по-видимому, четыре цистрона — К и D, Ss и Slp и один функционально единый locus Ig-1. Каждый из них по-разному проявляется и регулируется. Конечно, в этом регионе может быть много неизвестных генов. Единственным общим признаком является то, что продукты К и D и Ig-1 представляют собой поверхностные компоненты. Рассмотрим этот признак.

Меня смущает, что только два мембранных белка К и D, по-видимому, имеют всевозможные особые свойства в качестве иммуногенов, которых нет у других поверхностных антигенов, поэтому я чувствую обесчелование от мысли, что особые иммуногенные свойства К и D сейчас вновь исследуются. Одно особое свойство состоит в том, что индукционная ксеногенная стиму-

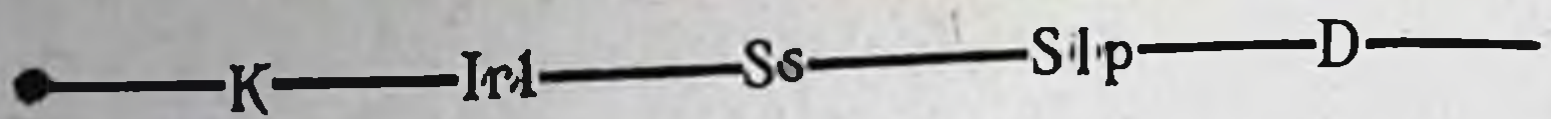


Рис. 84. Карта комплекса H-2, начиная от центромеры.

ляция менее сильна, чем аллогенная. Теперь это нельзя считать общим правилом (Bach, 4-я сессия; Widmer, Bach. — «J. Exp. Med.», 1972, v. 135, p. 1204). Другое особое свойство заключается в том, что очень многие антигенчувствительные клетки, видимо, отвечают на аллогенные стимулы детерминантов на аллельных белках K и D. Теперь в этом нет уверенности, так как тест системы не отличает индукции от эффекторных процессов. Следовательно, возможно, что при тесте подсчитываются эффекторные, а не антигенчувствительные клетки (обсуждается в статье Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 529). Кроме того, возможно, действует аномальная индукция (раздел VI). Наконец, результаты тестов в СКЛ зависят от многих поверхностных компонентов наряду с K и D. Это последнее наблюдение доказано в работе Bach, Klein, Shreffler, von Rood (2-я сессия). Гены, которые у мыши находятся между K и D, кодируют поверхностные детерминанты, являющиеся основными индукторами ответности в СКЛ. Это более понятно по двум причинам.

Во-первых, чем больше число различий (степень чужеродности) между отвечающей популяцией и популяцией-мишенью, тем сильнее предполагаемая реакция в СКЛ. Если эти новые детерминанты являются иммуноглобулинами, частично кодируемыми локусом $Ig-V_H^T$, то полиморфизмов должно быть не меньше, чем в локусе $Ig-V_H^B$. Напоминаю, что многие различия, обусловленные структурными генами V_H^B , были обнаружены при анализе генетики идиотипа эффекторных антител (3-я сессия). Кроме того, аллотипические маркеры, исследуемые как серологически, так и на основании их последовательности, метят локус V_H у кролика и локус V_k у мышей, например I_v -пептид (раздел II, B). Именно по аналогии с $Ig-V_H^B$, а также по общим соображениям я полагаю, что кодируемый $Ig-t$ -клеточный рецептор весьма полиморфен и, следовательно, может выявляться методами, применяемыми для определения детерминантов гистосовместимости. Примеры мы видели в работах Ramseier и Lindenman (раздел III, B), Green (раздел V, B, 1) и Simonsen (раздел IV, B).

Во-вторых, если тест в СКЛ в принципе является индукционной системой *in vitro*, то наряду с нормальной индукцией t - и B -клеток посредством ассоциативного распознавания детерминантов клеточной поверхности должна действовать и аномальная индукция. Действительно, при некоторых сочетаниях клеток аномальная индукция может быть более сильным стимулом.

Я рассматриваю локус $Ig-t$, проявляющийся в t -клетках, как ряд смежных генов V_H^T , сцепленных с геном C_H^T , аналогичным по структуре известному локусу тяжелых цепей $V_H^B C_H^B$, проявляющемуся в B -клетках. Таким образом, понятно, что локус $Ig-t$, состоящий из многих генов, селекцией удерживается вместе, а не рассеивается по геному. Если аналогия справедлива, то для механизма соединения V с C путем транслокации, происходящей только в цисположении, а также для аллельного исключения, возможно, требуется, чтобы семейство V -генов было смежным и физически прилегало к соответствующим C -генам.

Рассмотрим теперь эволюцию $Ig-t$. Јегпе («Eug. J. Immunol.», 1971, v. 1, p. 1) предположил, что V -гены селекционируются для кодирования специфичностей, направленных против всех специфических основных де-

терминантов гистосовместимости, кодируемых аллельными локусами данного вида. В другом месте я пояснил, почему эта теория диверсификации, или разнообразия, маловероятна (Cohn. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1971, v. 190, p. 529). Однако сейчас мы рассматриваем мысль Jegre не как теорию диверсификации, а как теорию эволюции V-генов зародышевой линии. Bodmer («Nature», 1972, v. 237, p. 139) отметил, почему она неприемлема как теория эволюции, и предполагает, как спасти эту мысль. Исходя, как и Jegre, из первичной системы распознавания клетки клеткой, Bodmer предполагает, что V-гены эволюционировали из генов, кодирующих продукты, которые распознают собственные антигены, общие для всех особей вида. Иными словами, вместо селекции по распознаванию собственного детерминанта, с которой особь редко сталкивается, происходит селекция по распознаванию детерминантов, имеющихся у всех представителей вида, так как они по существу неизменны. Путем дупликации и транслокации из этого первичного набора единиц распознавания эволюционировали известные современные V-локусы. Эти современные V-локусы, очевидно, не подвержены требованию распознавания собственных антигенов и селекционируются для оптимального распознавания чужеродных антигенов. Разрабатывая теорию диверсификации, я предположил, что действие селекции на современные V-локусы направлено на кодирование специфичностей, имеющих непосредственное значение для выживаемости (раздел II, А). Размышления об эволюции, предшествующей этому современному периоду, могут показаться несколько *ad hoc* в данный момент, если бы не тот факт, что существует предположение, что локус Ig-1 является этой постулируемой «архаической или примитивной», системой распознавания клетки клеткой, которая сохранилась до современной эпохи под воздействием какой-то селекционной силы и на которую наслоились механизмы индукции и паралича. Я ожидаю доводов, которые будут приведены в этом споре, о том, являются ли ассоциативные антитела, кодируемые Ig-1, иммуноглобулином с таким же широким диапазоном и столь же специфичным, как эффекторные антитела (раздел V, Б).

Что означает тот факт, что в настоящее время Ig-1 находится рядом с K, D, Ss и Slp? Иммунологическое родство K и D и Ss и Slp означает, что они образовались посредством дупликации генов (Shreffler, David, Passmore, Klein. — «Transplant. Proc.», 1971, v. 3, p. 176). Это означает, что эволюционное начало каждой пары K и D или Ss и Slp функционально связано. Их структура показывает, что в настоящее время они все еще, вероятно, функционально связаны. Не существует никаких указаний и никакого объяснения того, почему локус Ig-1, картированный между K и Ss, должен считаться функционально связанным с ними, и вообще почему пары K и D и Ss и Slp должны считаться функционально связанными. Если Ig-1 является локусом тяжелых цепей, то маловероятно, что даже гены Ss, Slp находятся между V и C-генами Ig-1. Таким образом, наблюдения, что локус MLC у человека распространен кнаружи от интервала между Four и LA (2-я сессия), должны означать, что этот локус кодирует антигенные детерминанты, не родственные Ig-1. Иными словами, тест СКЛ ищет ген-продукты, включая продукты Ig-1 и многих других не связанных с ним локусов.

Если провести аналогию с $Ig-V_H^B$, который появился в результате дупликации генов, то можно заключить, что $Ig-V_H^T$, по-видимому, следовал по тому же пути. Дупликация генов путем неравного кроссинговера создала семейство генов V_H^T , образующих Ig-1-локус. Полиплоидия с последующей перестройкой хромосом, вероятно, привела к несцепленной дуп-

ликации этого локуса, который в дальнейшем превратился в локусы тяжелых цепей, меченных аллотипом, и, возможно, также в локусы каппа и ламбда. Это означает, что указанные несцепленные Ig-локусы, подвергшиеся дубликации, содержат сцепленные гены, подобные K и D, которые превратились в малые гены гистосовместимости. Было бы желательно поискать доказательства этого предположения. Следовательно, весьма интересно наблюдение, что ассоциативные антитела «подобны IgM», так как этого наблюдения следовало ожидать на основании того, что мы знаем об эволюции иммуноглобулинов. Первым классом тяжелых цепей, образовавшимся в виде эффекторных антител, был IgM (продукт В-клеток). Следовательно, предполагается, что его постулируемый прямой предшественник, продукт $Ig-V_H^T$ (продукт t-клеток), должен быть подобным IgM.

Теперь я поставлю вопрос о том, почему локус Ig-1, если он оказался случайно между K и Ss, остался там на протяжении всей эволюции млекопитающих? Прежде всего у нас есть указания на то, что Ig-1 сцеплен с основным локусом гистосовместимости только у мышей, крыс и морских свинок. Однако меня не удивило бы, если бы это оказалось общим правилом. Я мог бы допустить, что положение Ig-1 между K и Ss как бы заморозилось вследствие наслоившегося механизма или из-за того, что возможность разделения тесно сцепленных генов невелика. Возьмем пример наслоившегося механизма: гены на X-хромосоме оставались сцепленными на протяжении эволюции, пока ее роль определяет пол. Гены на этой X-хромосоме, по видимому, не более связаны функционально друг с другом, чем с аутосомным геном. Что же удерживает их вместе?

Когда хромосома, несущая «случайный» в функциональном смысле набор генов, приобрела ген, детерминирующий пол, то возникла селекция по компенсированию дозы. Этот наслоившийся механизм зафиксировал набор, так как любой X-сцепленный ген, который переместился бы на аутосому, мог бы нарушить дозированную комплементацию и отменить селекцию (Ohno. — Sex Chromosomes and Sex-linked Genes. Springer-Verlag, Berlin, 1967). Возможно, существует аналогичный наслоившийся механизм, действующий на IX группе сцепления. Очевидно, примером такого механизма служит проявление локуса T (Bennet, Boyse, Old. — Cell Interaction. Silvestri ed North-Holland Publishing, Amsterdam, 1971, p. 247). Однако сцепление посредством наслоившихся механизмов — это не та функциональная связь, которую мы ищем.

Если исходить из того, что локус Ig-1 задержался между K и Ss, с которыми он не связан, то тенденция к удержанию их вместо объясняется тем, что вероятность установления у вида двух механизмов: транслокации и инверсии, которые разорвали бы сцепление, очень мала. Транслокация часто ведет к неправильному подбору пар при мейозе, и дефектное потомство (часто стерильное) погибает с потерей этого уже редкого явления. Инверсия чаще всего инактивирует функцию. Кроме того, большинство разрывов в самом регионе Ig-1, которые отделили бы его от K, D, Ss или Slp, уничтожили бы его функцию. Далее, если существует функциональная связь, благодаря которой селекция удерживает сцепление цистронов K и D, то не связанный локус Ig-1 и гены Ss—Slp также удерживались бы в сцепленном виде. В некотором смысле соотношение K—D можно рассматривать как наслоившийся механизм, который удерживает вместе Ig-1 и Ss—Slp.

Мое последнее замечание касается того факта, что продукт Ig-1 может быть выявлен (или обнаружен) при тесте как рецептор антигена на t-клетках и как поверхностный компонент, который полиморфен (антиген гистосовместимости). Что означает этот факт? Как раскрыть «тайну гордиева узла»,

которая окружает наши повторные попытки проверить концепцию «гены гистосовместимости против генов-рецепторов (распознавание)»? Приведет ли нас куда-нибудь открытие, что все остальные Iг-локусы, например, Iг—V_H^B, сцеплены с генами, кодирующими полиморфные поверхностные детерминанты?

При помощи многочисленных тестов, рассмотренных здесь, очевидно, можно было бы обнаружить в качестве антигенов гистосовместимости сотни полиморфных компонентов мембраны. У мыши в гаплоидном наборе имеется только 20 хромосом, поэтому ясно, что любой произвольно избранный ген должен быть сцеплен с каким-то геном гистосовместимости. Сцепление специфических доминантных Iг-генов с чем-то, называемым H-1, H-2, H-3, — это еще не причина для того, чтобы утверждать наличие функциональной связи между ними. Правда, продукты основных генов гистосовместимости в качестве антигенов обладают некоторыми особыми свойствами. Они высокоиммуногенны. Однако этот факт пока еще не дает нам точных оснований связывать функцию Iг-1 с H-2, K или D. Если продукт цистронов H-2 K и D проявляется во всех клетках в относительно высокой концентрации и гомогенен у особи, то понятно, что эти продукты являются относительно хорошими иммуногенами. Если иммунизировать животное такой гетерогенной смесью, как сывороточный иммуноглобулин, то общий ответ будет очень сильным, но шансы получить данную специфичность против идиотипа очень малы. Однако любой данный миеломный белок вызывает отличающийся антиидиотипический ответ. В СКЛ изучается общая сумма различий между двумя клетками, которая может быть большой (аналогична ответу на сывороточный иммуноглобулин). Однако уровень ответа к отдельным компонентам будет зависеть от того, какую часть они составляют из общей суммы и насколько велика полиморфная разница или степень чужеродности. Тот факт, что некоторые антигены гистосовместимости являются основными, а другие второстепенными, зависит от многих факторов, не связанных со специфическими свойствами иммунной системы.

Если Iг-локусы являются структурными генами для субъединиц иммуноглобулина, то возникает вопрос, какие поверхностные компоненты нужны для их проявления и по этой причине кодирующие гены, сцепленные в качестве «регулона», т. е. единого целого регулируемых вместе генов. Возможно, что такие компоненты нужны для вставления рецептора в мембрану и для ощущения взаимодействия с антигеном. Однако, с одной стороны, маловероятно, что примером этого могут быть поверхностные компоненты, проявляющиеся во всех клетках, например K и D, с другой, когда мы изучаем известные примеры взаимодополняющих субъединиц или функционально связанных белков, то чаще всего убеждаемся, что они не кодируются сцепленными генами. Хорошим примером является иммуноглобулиновый рецептор В-клеток, состоящий из легких и тяжелых субъединиц, кодируемых несцепленными генами.

Я считаю, что необходимо сделать следующий вывод:

Хромосомный сегмент K—Iг-1—Ss—Slp—D теперь представляется нам очень простым. K, D, Ss и Slp, видимо, являются одиночными цистронами. Их необычайное свойство заключается в высокой степени полиморфизма K- и D-генов. Эволюционная селекция многих антигенных вариантов продуктов K и D связана с их функцией, как отмечал Bodmer («Nature», 1972, v. 237, p. 139). Напротив, Iг-1-локус селекционируется так, что продукт функционирует в качестве рецептора. Эта последняя селекция по рецепторной функции неизбежно ведет к полиморфным антигенным различиям между продуктами. Однако для функции Iг-1-локуса эти антигенные

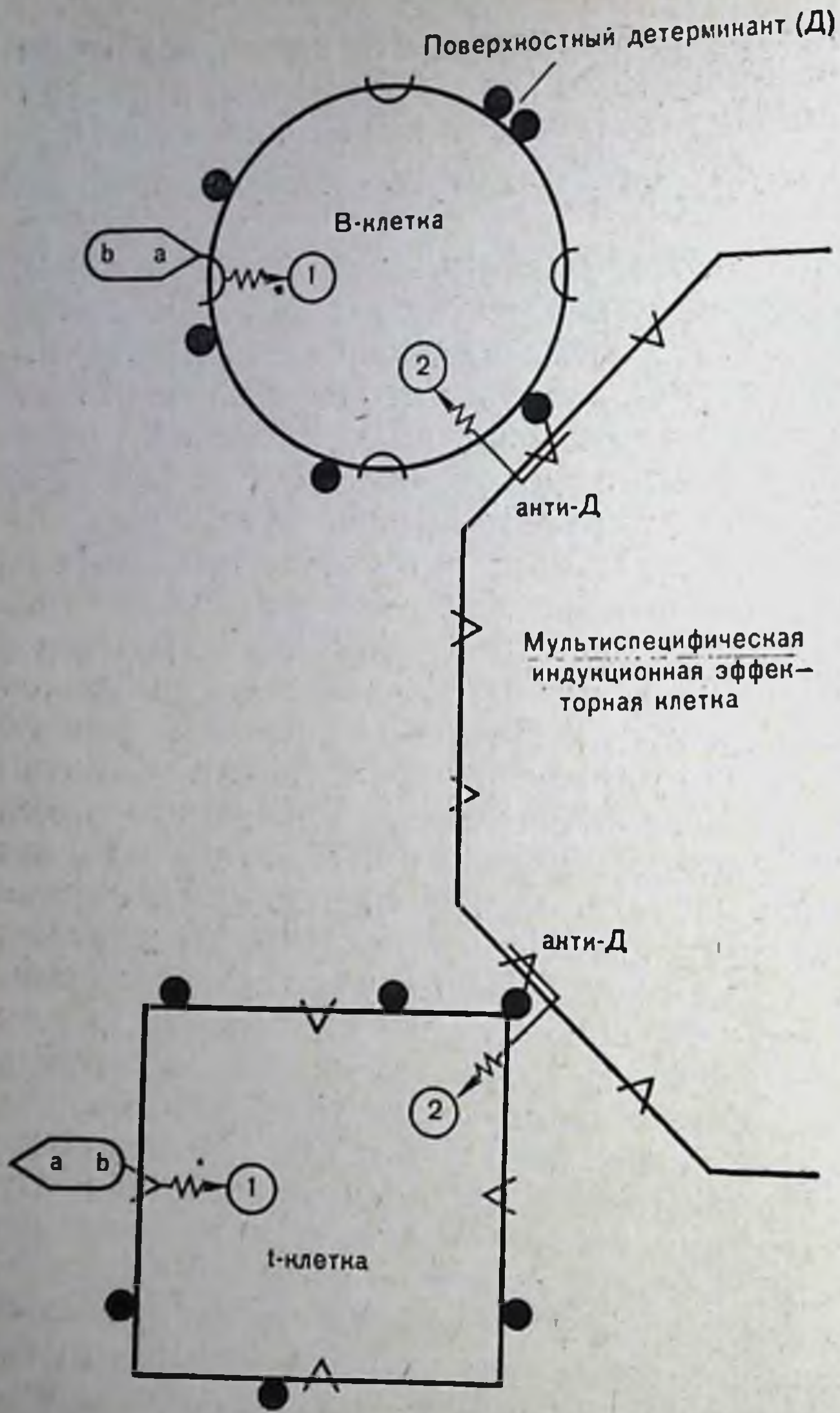


Рис. 85. Модель ассоциативного распознавания при аномальной индукции.

различия в процессе селекции отступают на второй план, тогда как для К и D они являются основной целью селекции. Пока еще никто не представил нам оснований ставить знак равенства между этими функциями для того, чтобы объяснить сцепление К, D и Ig-1.

VI. ГЕНЕТИКА АНОМАЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ

Генетика иммунной ответственности может быть несколько замаскирована менее прямыми эффектами, и, прежде чем закончить свое выступление, я хотел бы рассмотреть один из важнейших примеров.

Модель ассоциативного распознавания при нормальной индукции (см. рис. 81 и 82) предсказывает существование аномальной индукции (рис. 85) (Cohn. — «Immunol. Inter.» Academic Press, N. Y., 1971, p. 82; Bretscher. — «Cell. Immunol.», 1973, v. 6, p. 1). В аномальном случае сигнал 1 поступает посредством взаимодействия антигена с рецептором, как и при нормальной

индукции, но сигнал 2 поступает посредством взаимодействия ассоциативных антител с поверхностным детерминантом на антигенчувствительной клетке. Таким образом, различения «своего» и «чужого» не происходит, так как взаимодействие рецептора с собственным компонентом, которое в норме вызвало бы паралич (сигнал 1), превращается в индукционное явление посредством взаимодействия ассоциативных антител с компонентом клеточной поверхности, генерирующим сигнал 2. В эксперименте этот феномен впервые наблюдал McCullagh («J. Exp. Med.», 1970, v. 132, p. 916), как нарушение ареактивности к бараньим эритроцитам аллогенными лимфоидными клетками. Позднее Katz и Benacerraf (см. «Adv. Immunol.», 1972, v. 15, p. 2) и Kreth, Williamson («Nature», 1971, v. 234, p. 454) продолжили наблюдения McCullagh и установили, что при добавлении аллогенных лимфоидных клеток можно индуцировать синтез антител к детерминанту на антигене в тех условиях, в которых он практически не иммуногенен. Феномен аномальной индукции получил название моделей индукции

«трансплантат против хозяина», «аллогенной» или «клеточного надзора». Я думаю, что это неудачно, так как приведенные названия вносят путаницу в механизм опосредованного клетками умерщвления и индукции (раздел III, В, 2). То, что, с моей точки зрения, представляется полной путаницей, является основным принципом для Kreth, Williamson и корреспондента журнала «Nature» (1971, v. 234, p. 439). Прошу извинить меня за то, что я так формулирую эту проблему, но эта формулировка иллюстрирует роль конкурирующих концепций.

Есть несколько причин, почему я в заключении своего выступления анализирую аномальную индукцию.

А. Опыты Gimet, вызвавшие переключение с IgM к IgG у слабо отвечающих животных

Gimet (1-я сессия) доказал, что синтез IgG можно индуцировать, если создать условия аномальной индукции у слабо отвечающих животных, дающих только ответ IgM. Этот результат понятен, так как взаимодействие антигена с рецептором происходит при нелимитирующем уровне сигнала 2, более чем эквивалентном по эффекту, с высоким уровнем ассоциативных антител, индуцируемых нормальной индукцией у сильно отвечающих животных. Аномально индуцированный (через сигнал 2) переход от IgM к IgG доказывает, что синтез IgM лимитировался до устойчивого уровня количеством доз сигнала 2, т. е. эффективным уровнем ассоциативных антител. Этот опыт весьма важен не только потому, что является основным подходом к механизму индукции, но и потому, что он опровергает весьма распространенное мнение о роли t-клеток, а именно, что кооперация или ассоциативное распознавание служит исключительно хелперным механизмом для «концентрирования», «предъявления», «переработки», «усиления», «фокусирования», «задержки» или «топологического расположения» антигена. Если так называемый тимусзависимый антиген (Т,Г)-А-Л может быть превращен в иммуноген у слабо отвечающих животных и может индуцировать антитела IgG, посылая сигнал 1 через взаимодействие рецепторов с антигеном и сигнал 2 через взаимодействие ассоциативных антител с детерминантом гистосовместимости, то t-клетка не может быть «хелперной» через предъявление антигена (см. рис. 85). Система разобщила нормальное распознавание антигена как рецептором, так и ассоциативными антителами. При наличии модели ассоциативного распознавания ретроспективно можно утверждать, что мы могли предсказать, но, к сожалению, не предсказали, что гаптены (неиммуногенные молекулы) должны превращаться в иммуногены посредством аномальной индукции, как, например, у Katz, Davie, Paul, Bepasegaf («J. Exp. Med.», 1971, v. 134, p. 201). Однако было высказано предположение, пока еще не проверенное, что низкомолекулярные гаптены, например ДНФ-лизин, могут «парализовать» (Cohn. — «Immunol. Toler.» Academic Press, N. Y., 1969, p. 298). Очевидно, можно продолжить эту мысль и сказать, что если сигнал 2 будет поступать посредством аномальной индукции, то очень низкомолекулярные вещества, как ДНФ-лизин, должны стать иммуногенными, а тимуснезависимые антигены должны вызвать переключение от синтеза IgM к IgG. Изучение моновалентных взаимодействий с рецептором, например ДНФ-лизина, сопряженного с аномальной индукцией, даст возможность количественно исследовать чувствительность к индукции, присущую В-клеткам, продуцирующим IgM и IgG. Пока еще это предположение не проверено в отношении переключения.

Тот факт, что модель ассоциативного распознавания подсказывает такие точные опыты и позволяет предугадать их исход, безусловно является ее достоинством.

Б. Анализ генерализованного аутоиммунитета по Bretscher

Bretscher весьма элегантно развил концепцию аномальной индукции, чтобы объяснить феномен генерализованного аутоиммунитета (Bretscher, Cell. — «Immunological», 1973, v. 6, p.1). Он утверждает, что когда на t-клетке появляется новый чужеродный поверхностный детерминант, то в известных условиях аномальная индукция, происходящая путем распознавания этого поверхностного детерминанта ассоциативными антителами, индуцирует t-клетки со специфичностью против t-клеток. Когда это случается, происходит каскадирование системы, не подлежащее никакому контролю, индуцируются ассоциативные аутоантитела к B-клеткам и в конечном счете B-клетки индуцируются против «своего», например против эритроцитов, против ядерной мембраны, против нуклеиновой кислоты и т. д. Таким образом, аномальная индукция саботирует иммунную систему и основная сила соматической селекции действует через собственные антигены, как у мышей NZB. Понятно, что эти животные лучше отвечают на некоторые антигены, подобные своим, например бараньи эритроциты и БСА, чем на очень чужеродные антигены, например гемоцианин (Cerottini, Lambert, Dixon. — «J. Exp. Med.», 1969, v. 103, p. 1093). Здесь уместно отметить, что генерализованный аутоиммунитет, вызванный аномальной индукцией, является экспериментальным доказательством того, что различие «своего» и «чужого» не кодируется генами зародышевой линии, а приобретает или заучивается.

На 5-й сессии перед нами стояла проблема происхождения нового чужеродного детерминанта t-клеток и распознавания его ассоциативными антителами, кодируемыми Ig-1. Проявление преимущественно частного аутоиммунного ответа, например против эритроцитов, против ядер и т. д. или антител, обращенных преимущественно к новому детерминанту, зависит от других сложных генетических и негенетических факторов, не имеющих отношения к настоящей дискуссии.

Я сознаю, что мой подход к этому сложному феномену несколько упрощен, даже если я говорю только о проблеме происхождения нового и чужеродного поверхностного детерминанта, появляющегося на t-клетках, и о распознавании его продуктом Ig-1. Одна из сложностей, которую я не буду рассматривать, — это эффект степени иммуногенности нового детерминанта. Сильно иммуногенный детерминант, например вирусный компонент, появляющийся на t-клетке, скорее всего приведет к поражению этой клетки, и, таким образом, состояние генерализованного аутоиммунитета не установится. Слабо иммуногенный детерминант, например TL или фетальный антиген, скорее не вызовет отторжение и допустит каскад, направленный к генерализованному аутоиммунитету.

В. Болезни аномальной индукции

На 5-й сессии мы рассматривали то, что я хочу назвать здесь болезнями аномальной индукции. Мы имели в виду взаимодействие с вирусом лимитированной цитопатогенности для t-клеток. В результате на t-клетках появляется поверхностный детерминант, к которому у животного нет толерантности, например ЛХМ, TL, FMR, G или любой зародышевый либо диф-

ференцирующий антиген. В принципе, конечно, тот же результат может дать любое чужеродное вещество, цитофильное для антигенчувствительных клеток. Если это произошло, то возможен и самый мощный из индукционных сигналов — аномальная индукция, при условии, что локус Ig-1 допускает распознавание нового детерминанта так, что процесс может начаться. Локус Ig-1 обычно проявляется не по принципу «все или ничего», поэтому может измениться только срок начала каскадного процесса (образование вначале ассоциативных антител против t-клеток, а затем против В-клеток). Следовательно, начальный процесс, зависящий от контролируемого Ig-1 распознавания нового детерминанта, может быть замаскирован, если исследовать только поздние проявления болезни.

Термин «уязвимый» или «резистентный» вводит в заблуждение, когда мы говорим об эффектах, контролируемых Ig-1. Этот локус определяет только специфичность ассоциативных антител. Поэтому распознавание на высоком уровне или аффинитете доминировало бы над распознаванием на низком уровне или аффинитете. Следовательно, можно было бы считать вероятным, что при доминировании «уязвимости» над «резистентностью» «уязвимость» означала бы сильно отвечающее животное, а «резистентность» — слабо отвечающее и наоборот.

Доминирование уязвимости к ЛХМ (Oldstone, 5-я сессия), как и ожидалось, является результатом сильно отвечающего аллеля Ig-1. В случае вируса Фрейнда ситуация более сложна, так как скрещивание уязвимых животных с резистентными дало промежуточный фенотип (Lilly, 5-я сессия). В этой ситуации эквивалентом сильной отвечаемости может быть любой аллель Ig-1. Если бы резистентность доминировала, как утверждает Pincus (5-я сессия), то этот аллель Ig-1 был бы эквивалентом сильной отвечаемости (я обращаюсь к фактору вероятности и минуя более логический подход, которого придерживаются Lilly и Oldstone, чтобы по-новому подойти к этому сложному феномену).

Затем следует вопрос: что означает «сильный ответ», против чего он обращен? Если различие Ig-1 направлено на вирусный антиген, то почему мы наблюдаем лишь незначительное различие между линиями на уровне сывороточных антител к FMR или ЛХМ?

При инфекциях вирусом Фрейнда аллельная разница Rgv-1 (Ig-1) проявляется в поздней стадии болезни. Когда начинается аномальная индукция, так что появляются ассоциативные антитела против В- и t-клеток, индукция ответа В-клеток против FMR будет разобщена с обязательным распознаванием ассоциативными антителами к FMR. Разница между аллелем Ig-1 сильного и слабого ответа количественная, а не качественная, поэтому у сильно отвечающего животного раньше запускается аномальная индукция иммунного ответа, но в дальнейшем слабо отвечающее животное его догоняет. Возможно, что аналогичная ситуация существует при инфекции ЛХМ. Тестом на уязвимость и резистентность является смерть, т. е. поздний симптом. Следовательно, первоначальное различие Ig-1 или распознавание поверхностного антигена, детерминированного ЛХМ, нельзя обнаружить, если в поздней стадии инфекции определять уровень сывороточных антител к ЛХМ.

Если допустить, что сильная отвечаемость означает резистентность к вирусу Фрейнда, то иммунный эффекторный механизм должен действовать, но не вполне успешно, отторгая вирусную опухоль. Сложность в том, что аномальная индукция снижает способность к действию механизма иммунного надзора, нарушая регуляцию балансированных эффекторных функций и направляя потенцию распознавания от чужеродных к своим детерми-

нантам. Этот феномен аномальной индукции является одним из самых впечатляющих примеров того, как вирус может избежать селекционное воздействие иммунной системы. Он саботирует механизм ассоциативного распознавания, регулирующий различие «своего» и «чужого». Это допускает относительно медленную гибель животного в результате аутоиммунитета и возможность выживания вируса.

Я не буду говорить здесь о фенотипе NZB, так как он был прекрасно рассмотрен Bretscher — («Cell. Immunol», 1973, v. 6, p. 1). Я просто продолжу одно предсказание, сделанное Bretscher. Если ген Ig-1 регулирует фенотип уязвимости и резистентности путем распознавания индуцированного вирусом чужеродного поверхностного детерминанта и последующей аномальной индукции, то общим признаком должно быть раннее появление антител против t-клеточных антигенов. Очевидно, это окажется в дальнейшем важным диагностическим средством.

Г. Другие взгляды на то, как нарушается толерантность к «своему»

Многие авторы отмечали связь между вирусной инфекцией и аутоиммунитетом (например, Allison, Denmon, Bagnes. — «Lancet», 1971, v. 2, p. 135). Однако эти исследования допускали, что главный, если не единственный, механизм нарушения толерантности опосредован «эффектом носителя», который «может стимулировать В-клетки в выработке аутоантител». Они предполагают, что основное значение имеет разница между тимусзависимыми и тимуснезависимыми антигенами и что ассоциативное распознавание не обязательно для нормальной индукции, поэтому они проходят мимо феномена аномальной индукции. Кроме того, они не могут объяснить происхождения толерантности к «себе», они просто допускают ее существование. Согласно модели ассоциативного распознавания, если вводится антиген, вступающий в перекрестную реакцию со «своим», то начинается конкуренция между своим и перекрестно-реагирующим чужим компонентом. Только в особых условиях можно нарушить таким образом толерантность. Экспериментальная модель (Benjamin, Weigle. — «J. Exp. Med.», 1970, v. 132, p. 66) доказывает, что нарушение паралича является функцией конкуренции между антигеном, вызвавшим паралич, и антигеном, примененным для нарушения паралича. Эта конкуренция отчасти зависит, во-первых, от оптимальной степени перекрестной реакции, во-вторых, от относительной концентрации двух компонентов. Следовательно, нарушение толерантности посредством нормального ассоциативного распознавания происходит относительно легко, если свой компонент присутствует в следовых количествах, например гормон, подобный тиреоглобулину, или идиотипический детерминант, так как провоцирующий перекрестно-реагирующий иммуноген вводится в концентрации, во много раз большей, чем «свой» компонент. Постоянно забывают об этом обстоятельстве, а именно, что «свой» компонент конкурентно блокирует нарушение толерантности перекрестно-реагирующим антигеном. Если бы для нарушения толерантности требовался только контакт с антигеном, вступающим в перекрестную реакцию со «своим», то ни одно животное не могло бы выжить, так как оно существует в море таких антигенов. Именно потому, что конкуренция со стороны собственного компонента не замечается, изобретаются многочисленные наслоившиеся или вторичные механизмы, например «супрессивные Т-клетки», для образования аутоантител (Allison. — «Lancet», 1971, v. 2, p. N 135, p. 1401) или выживаемость у животных только антигенчувствительных клеток против «своего» с очень низким аффинитетом (ареактивных), которые могут инду-

цироваться «концентрированным» антигеном в результате взаимодействия хелперных t-клеток с перекрестно-реагирующим антигеном (Taylor, Ivergen, — «Proc. Roy. Soc. London (B)», 1971, v. 176, p. 393). Попутно говоря, генерализованный аутоиммунитет, обусловленный аномальной индукцией, исключает это последнее мнение на основании экспериментальных данных.

Если перекрестно-реагирующим компонентом является измененная поверхность t-клеток, вследствие появления нового чужеродного детерминанта (вирусного или индуцированного вирусом), то вероятность нормальной индукции вместо аномальной индукции аутоантител к t-клеткам будет зависеть от того, насколько массивна вирусная инфекция. По мере того как увеличивается количество t-клеток, проявляющих чужеродный детерминант, возрастает тенденция к обоим видам индукции — нормальному и аномальному — вместо паралича. Однако при низких уровнях инфекции больше вероятность прорыва и каскада к генерализованному аутоиммунитету через аномальную индукцию вместо нормальной. Темпы двух процессов сближаются при повышении уровня инфекции. Я не утверждаю, что толерантность к «своему» не может быть нарушена только нормальной индукцией. Я просто указываю, что требуются особые условия для того, чтобы проявилась аутоиммунная реакция посредством этого механизма, и что эти условия надо анализировать в каждом случае. Важным примером, заслуживающим размышлений, является индукция системной красной волчанки прокаинамидом (Whittingham, Mackay. — «Aust. Ann. Med.», 1970, v. 4, p. 358).

Хотя этот вопрос прямо не связан с темой, я хотел бы остановиться на экспериментальном примере, который Green рассматривает как нарушение толерантности (сессия 5). Ответ у морских свинок на лимитирующие концентрации «собственного компонента» — сывороточного альбумина, измененного различным образом, детерминируется специфическим доминантным путем аналогом докуса Ig-1, существующим у морских свинок. Green предлагает следующее объяснение. У отвечающего животного имеется ген иммунного ответа зародышевой линии, кодирующий распознавание t-клетками детерминанта на массивном сывороточном альбумине. Если этот ген-продукт каким-то образом проявится, например путем нарушения толерантности, то у отвечающего (не у неответающего) животного могут быть индуцированные антитела к измененному альбумину путем кооперации между t-клетками, распознающими нативный детерминант, и B-клетками, распознающими гаптены или измененный детерминант. Это объяснение внутренне противоречиво. Нарушение толерантности, необходимое для выявления предполагаемого закодированного Ig-геном распознавания собственного детерминанта, предполагает ассоциативное распознавание как измененного детерминанта или гаптена, так и нативного детерминанта ассоциативными антителами t-клеток. Только таким образом можно индуцировать t-клетки отвечающего животного, в которых проявляется постулируемый продукт гена Ig-1, антитела к собственному сывороточному альбумину. Если t-клетки могут распознать измененный детерминант или гаптен, чтобы кооперировать с индуцирующими ассоциативными антителами, которые нарушают толерантность к нативному детерминанту, то, очевидно, они должны быть способны кооперировать, индуцируя B-клетки против гаптена. Следовательно, нет оснований предполагать распознавание t-клетками нативного детерминанта для индукции антител B-клеток против гаптена. Далее, разница между отвечающим и неответающим животным наблюдается только при самых низких провоцирующих концентрациях измененного альбумина.

на. У животного имеется нормальное количество нативного сывороточного альбумина (порядка 1 г), а доза измененного альбумина, необходимая, чтобы наблюдать разницу ответов, равна 1 мкг (в 10^6 раз меньше). Массивный уровень нативного компонента блокировал бы любое нарушение толерантности к себе следами перекрестно-реагирующего иммуногена. Следовательно, я предполагаю, что Ig, кодирующий разницу ответов, допускает распознавание детерминанта, общего для всех использованных иммуногенов. Если нельзя представить себе, что различные изменения сывороточного альбумина ведут к такому общему чужеродному детерминанту (Green, 5-я сессия), то можно предложить два других объяснения. Во-первых, возможно, что в полном адьюванте Фрейнда существует иммуногенное вещество, к которому абсорбируется измененный альбумин и которое служит «носителем». Во-вторых, иммуногенное вещество в адьюванте может абсорбироваться на поверхности антигенчувствительных клеток или может быть цитотропно к ним, и клетки индуцируются к образованию антител против гаптена посредством аномальной индукции. Вероятно, таким образом действуют многие лектины, например Кон-А, МЛ и т. д., и бактериальные продукты, например липополисахарид (см. раздел VI, Д).

Д. Экспериментальный случай аномальной индукции

Существует диапазон исследованных в эксперименте ситуаций, в которых происходит аномальная индукция, помимо вызванных вирусами аутоиммунных болезней и болезней иммунных комплексов. К ним относятся новообразования, индуцированные аллогенными клетками, ответы t- и В-клеток, стимулируемые лектинами (ФГА, Кон-А и т. д.) и липополисахаридом (см. дискуссию Bretscher, Cell. — «Immunological», 1973, v. 6, p. 1; Bretscher. — «Transplant. Rev.», 1972, v. 11, p. 218). Конечно, если на t- или В-клетке помещен чужеродный детерминант, например лектины или липополисахарид, то может действовать такой же механизм аномальной индукции, как при инфекции некоторыми вирусами. Следовательно, это несколько осложняет иммунологическое поведение лектинов и липополисахарида, но так, что это легко понять. Например, липополисахарид разрешает ответ селезенки «голых» мышей на бараньи эритроциты (Sjoberg, Anderson, Möller. — «Eur. J. Immunol.», 1972, v. 2, p. 326) и ответ нормальной селезенки на неиммуногенное вещество (Schmidtke, Dixon. — «J. Exp. Med.», 1972, v. 136, p. 392). Если бы липополисахарид был цитотропным для В-клеток, то аномальная индукция антител против бараньих эритроцитов произошла бы вследствие взаимодействия рецептора В-клеток с бараньими эритроцитами (сигнал 1) и взаимодействие ассоциативных антител с липополисахаридом (сигнал 2). Припоминаю, что я уже говорил о так называемой тимуснезависимости липополисахарида, объясняемой тем, что ассоциативные антитела весьма эффективно распознают его по сравнению с бараньими эритроцитами. «Голые» мыши не лишены ассоциативных антител. Они «опустошены» в такой мере, что ответ на очень чужеродные полимеры, в частности липополисахарид, все еще заметен. В принципе лектины и липополисахарид стимулируют ответ к антигенам посредством механизма, такого же как после инъекции аллогенных клеток.

Я предполагал, что возникновению реакции СКЛ содействует возможно аномальная индукция (раздел V, В). Такая реакция была бы отчасти резистентной к рентгеновым лучам и митомицину. Представим себе две популяции клеток — отвечающую популяцию и клетки-мишени (обработанные митомицином или рентгеновыми лучами); исследуются исключительно толь-

ко включения тимидина в ДНК отвечающей популяции. Стимуляция синтеза ДНК зависит от распознавания рецепторами отвечающей популяции чужеродных детерминантов на мишени. Можно представить себе, что в СКЛ происходит три взаимодействия. Простое взаимодействие рецепторов с детерминантом было бы паралитическим сигналом (1). Мы не знаем, подвергается ли клетка делению прежде, чем инактивируется, но это взаимодействие в отдельности, вероятно, мало отражается на результатах теста.

Нормальная индукционная стимуляция отвечающей популяции могла бы быть обусловлена нормальным ассоциативным распознаванием детерминантов на клетке-мишени. Индукция *in vitro*, вероятно, весьма влияет на результаты теста. Однако уровень ответа лимфоцитов на лимфоциты мишени (СКЛ) значительно больше, чем уровень ответа лимфоцитов на эритроциты, фибробласты, метаболически заблокированные клетки мишени, например обработанные формальдегидом, или простые антигены, поэтому я предполагаю, что действует также механизм аномальной индукции, т. е. клетка-мишень вносит в индукцию отвечающей клетки больше, чем просто антигенные детерминанты.

Для того чтобы действовала аномальная индукция, клетка-мишень должна быть источником не только чужеродных детерминантов, но и каких-то ассоциативных антител против поверхностных детерминантов отвечающей клетки. Митомицин и рентгеновые лучи, вероятно, не влияют на уровень ассоциативных антител до культивирования. Эти антитела могут просочиться от антигенчувствительной клетки-мишени к клетке-эффектору индукции или уже присутствовать на этой последней клетке. Таким образом должна индуцироваться отвечающая антигенчувствительная клетка, получившая сигнал 1, посредством взаимодействия своего рецептора с каким-либо лигандом в среде, иммуногенным (например, сыворотка клетки-мишени) или неиммуногенным (например, сахара, пептиды, липиды, собственные компоненты и т. д.), так как сигнал 2 поступает через взаимодействие ассоциативных антител с поверхностным детерминантом. Возможно, что этот эффект является основным.

Некоторые из вас, очевидно, склонны были бы прежде всего заметить, что взаимодействие СКЛ между двумя родительскими культурами (отвечающей и культурой-мишенью) включало бы нормальную или аномальную индукцию. Тогда взаимодействие между отвечающими родительскими клетками и клетками-мишенями гибрида F_1 характеризовалось бы только нормальной, но не аномальной индукцией. Таким образом можно было бы определить роль каждого из двух эффектов. Опубликованные данные пока слишком противоречивы, и я не могу четко рассортировать их результаты, однако напому вам об опыте Ramseier—Lindemann, в котором гибридные клетки F_1 отвечали на идиотипические детерминанты родительских клеток. И, возможно, что этот ответ вызвал аномальную индукцию. Может быть неудача попыток повторить результаты (родительские клетки против F_1) отчасти объясняется различной ролью аномальной индукции.

Е. Анализ толерантности у аллофенных мышей, проведенный Allison

Установлено, что аллофенные (четырёхродительские) мыши, но не гибриды F_1 дают заметный иммунный ответ на собственные антигены гистосовместимости, определяемый по их способности как к клеточной реакции умерщвления родительских клеток, так и к блокированию этой реакции сывороточными антителами (Wegmann, Hellstrom, Hellstrom. — «Proc. Nat. Acad. Sci.», 1971, v. 68, p. 1644; Phillips e. a. — «Nature», 1971, v. 234,

р. 146). Этот опыт часто цитируется как основной эксперимент, доказывающий, что нормальная толерантность к «себе» опосредована балансирующим усилением, а не центральной недостаточностью иммунной системы. Мы должны рассмотреть этот опыт, так как он противоречит нашему мнению о том, как проявляется локус I γ -1 в регуляции различения «своего» и «чужого» (раздел III, А) и ослабляет ранее предъявленный довод о том, что специфическая доминантная отвечаемость не определяется толерантностью (раздел I, В). Allison («Lancet», 1971, v. 2, p. 1401) пытался объяснить эту разницу между аллофенными (четырёхродительскими) мышами и гибридами F $_1$ с помощью двух постулатов:

— антигенчувствительную клетку невозможно индуцировать к детерминантам на ее собственной мембране;

— антигены гистосовместимости, не присутствующие на каждой антигенчувствительной клетке, переносятся благодаря индуцированной «аутоиммунной» реактивности (блокирующие антитела к «своему» или избирательное, опосредованное клетками умерщвление обратной связью тех антигенчувствительных клеток, которые имеют рецепторы, специфические к собственным детерминантам гистосовместимости).

Эти два постулата относятся только к поверхностным, связанным с клеткой, антигенам. Они неприменимы к растворимым антигенам, и Allison предлагает нам два других основных правила для последних, на которых я не буду останавливаться.

Антигенчувствительная клеточная популяция гибридов F $_1$ гомогенна по своим поверхностным антигенам и, согласно первому постулату, не может им индуцироваться. Антигенчувствительная клеточная популяция аллофенных (четырёхродительских) мышей является смесью двух антигенных типов, и, таким образом, ограничения, вытекающие из первого постулата, здесь неприменимы, и оба антигенных типа взаимно индуцируют друг друга, как указано во втором постулате. Первый постулат слишком произволен, в этом можно убедиться, если задать вопрос: как связывающий участок рецептора против гистосовместимости на антигенчувствительной клетке узнает, что он взаимодействовал с детерминантом, подчиняющимся правилу? Второй постулат просто повторяет факт балансируемого усиления, который рассматривается как единственный механизм переносимости к собственным детерминантам гистосовместимости. Поверхностные антигены t-клеток иные, чем В-клеток, поэтому указанный постулат предполагает в качестве нормального механизма балансируемое усиление, чтобы две популяции взаимно не уничтожили друг друга. Однако это лишь ведет к допущению, что балансируемое усиление между t- и В-клетками саботирует различение «своего» и «чужого» вообще и неизбежно приводит к генерализованному аутоиммунитету. В эксперименте Wegmann и соавт. доказали, что, когда клеткой-мишенью является почечный фибробласт родительского типа, его убивают аллофенные клетки, а не клетки гибрида F $_1$ или родительские иммунные клетки. Следовательно, второй постулат, повторяющий тот факт, что смесь у аллофенных животных двух родительских типов антигенчувствительных клеток взаимно индуцируется, не может быть продолжен (на основании эксперимента), чтобы объяснить нормальное отсутствие ответов, например, к своим фибробластам у гибридов F $_1$ или у роди-

Согласно модели ассоциативного распознавания, гибрид является нормальным случаем, а аллофенная мышь — особым случаем. Уровень аутоиммунной реакции у аллофенных мышей крайне низок. В норме всегда происходит конкуренция между индукцией и параличом, поэтому по мере того, как

мы все больше повышаем чувствительность теста, в будущем мы сможем обнаружить даже у гибридов F_1 какой-то уровень индукции к собственным антигенам. Возможно, что балансированное усиление является второй линией обороны против аутоиммунных болезней в частных случаях у взрослых из-за того, что толерантность труднее установить (это зависит от дозы), чем сохранить (сохранение не зависит от дозы). Пока еще неизвестно первичного защитного механизма против аутоиммунных болезней. Конечно, у взрослых и даже новорожденных химер или в случаях опухолей, избегающих иммунного надзора, балансированное усиление действует как важный механизм, защищающий ткань. Я полагаю, что при нормальном развитии оно не действует как важный механизм.

Allison прав, указывая, как трудно придать животным ареактивность к антигенам гистосовместимости. Любопытно, что известные опыты Medawar по созданию «толерантности» к чужеродным кожным трансплантатам путем инъекции клеток новорожденным чаще всего удавались, когда ткани, применявшиеся для толерантности, были хорошим источником иммунных клеток, например селезенка, лимфатические узлы или костный мозг. Кроме того, во многих случаях было установлено, что трансплантат не отторгается благодаря балансированному усилению. Это понятно, так как инъекция клеток, чувствительных к чужеродным антигенам, новорожденному животному, которое не может их эффективно отторгнуть, создает идеальные условия для аномальной индукции, что ведет к аутоиммунитету или балансированному усилению. Среди животных, выживающих в опыте Medawar, некоторые могут быть действительно ареактивны, а у других устанавливается устойчивое состояние между индукцией блокирующих антител и опосредованным клетками умерщвлением, и индуцированные блокирующие антитела по принципу обратной связи подавляют индукцию того и другого. Для того чтобы установилось это устойчивое состояние, требуются многие сложные взаимодействия, на которых не буду сейчас останавливаться. Каким бы интересным ни был этот феномен, он не занимает центрального места при нормальной толерантности к себе.

Следовательно, аллофенные (четырёхродительские) мыши требуют особого объяснения. Можно предложить несколько объяснений.

Как я уже говорил ранее (раздел III, А), гибридные мыши становятся ареактивными к «своему». Аллофенные мыши, индуцированные на узком уровне к «своему», действуют подобно облученному взрослому животному, превращенному в химеру.

Иммунная система, развивающаяся из клеток одного родителя, у аллофенной мыши, возможно, становится достаточно зрелой, прежде чем встретится с клетками другого родителя, и реагирует на них как на чужеродные. Это означает, что аллофенная мышь, в отличие от гибрида, не представляет собой истинно гомогенной смеси двух родительских типов клеток. Такие объяснения аутоиммунной ответственности аллофенных мышей по сравнению с гибридами помогают нам включить этот факт в общую феноменологию иммунологии, не создавая особых правил для «растворимых» антигенов в отличие от «нерастворимых».

Обратимся с этой точки зрения к анализу модели «толерантности» при специфической доминантной ответственности (раздел I, В). Мы убедимся, что аллофенная мышь, происходящая от детерминированных Ig-1, отвечающих и неотвечающих родителей, обладает ответственностью. Если допустить, что постулируемый собственный компонент, сходный с тест-антигеном, не является у аллофенных мышей, то тогда этот опыт не проверяет модели

толерантности. Если предположить, что собственный компонент проявляется, но аллофенная мышь отвечает на него, как показывает «балансирующее усиление», то, очевидно, два разных механизма детерминируют специфическую доминантную отвечаемость на тест-антиген:

— отвечающий родитель и гибрид F_1 отвечают на тест-антиген, который распознается как чужеродный, так как собственный компонент, сходный с ним, у этих животных не проявляется;

— «трактовки» аллофенной мыши и неответающего родителя противоречат друг другу. Предполагается, что аллофенная мышь отвечает, хотя собственный компонент проявляется, так как животное индуцируется им и находится в устойчивом состоянии балансирующего усиления. Это состояние нарушается иммунизацией тест-антигеном, который нарушает толерантность к собственному компоненту. Не отвечающий родитель, который, как предполагается, также проявляет собственный компонент, не отвечает (в отличие от аллофенной отвечающей мыши), так как в нем центральным механизмом является истинная ареактивность.

Если бы аллофенная мышь была неответающей, то это убедительно подтвердило бы модели толерантности при специфической доминантной отвечаемости. Однако на практике они отвечают. Следовательно, труднее доказать, что модель толерантности неверна. Если допустить, что основным механизмом нормальной толерантности к «своему» является «балансирующее усиление», а не центральная недостаточность отвечаемости, то это приведет нас к противоречию. Низкий уровень аутоиммунитета у аллофенных мышей требует особых объяснений. Большинство этих объяснений было бы основано на допущении, что по той или другой причине установилось лишь частичное состояние паралича, и если бы модель толерантности была верна, то это состояние было бы выявлено (оно не выявляется) при сопоставлении отвечаемости гибридов и аллофенных животных к тест-антигену.

McDevitt предложил способ, как исследовать влияние на отвечаемость аутоиммунитета, наблюдаемого у аллофенных мышей, но не гибридов F_1 . Эксперимент заключается в изучении ответа аллофенной мыши, полученного при скрещивании двух детерминированных $Ig-1$ неответающих мышей, различных по локусам $H-2$.

Если, как и следовало ожидать, это животное будет неответающим (подобно гибриду F_1 между неответающими мышами), то низкий уровень аутоиммунитета у аллофенных мышей не может объяснить отвечаемость, наблюдаемую у аллофенных мышей, полученных при скрещивании отвечающих и неответающих, и модель толерантности при специфической доминантной отвечаемости исключена. Если аллофенная мышь, полученная при скрещивании неответающих животных, отвечает, то трактовка осложняется, так как вследствие низкого уровня аутоиммунитета животное может стать гиперреактивным (генерализованная отвечаемость) к слабому «подобному себе» иммуногену (Т, Г)-А--Л, подобно тому как мыши NZB дают повышенный ответ на некоторые антигены, сходные с собственными. В таком случае модель толерантности при специфической доминантной отвечаемости осталась бы непроверенной.

VII. ИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ЧЕЛОВЕКА

Мои заключительные замечания относятся к исследованию человека и к значению теории ассоциативного распознавания в этих исследованиях. Я уделю особое внимание проблеме, как детерминируют отвечаемость гены, кодирующие специфичность распознающих молекул. Следовательно, я го-

ворю почти исключительно о специфической доминантной отвечаемости. Лocus иммунного ответа, важнейший в этом отношении, тесно сцеплен с основным локусом гистосовместимости. Этот locus по крайней мере отчасти детерминирует специфичность ассоциативных антител. Допускаю, что аналогичная ситуация существует у человека. В большинстве исследований, проведенных на человеке, изучалась генетика антигенов гистосовместимости а не Ig-локуса. Эти работы были великолепны, так как они впервые указали на возможный состав с основного локуса гистосовместимости из двух цистронов Four и LA, а у мышей это K и D. Однако я рассматриваю проблему проявления Ig-локуса, а не генов гистосовместимости K и D или FOUR и LA. Большинство исследователей, как я уже заметил, ставят знак равенства между Ig-1 и генами гистосовместимости K и D или FOUR и LA, и связь между болезнью и типом HL-A в их трактовке означает, что «антигены гистосовместимости, возможно, имеют функциональные свойства, важные для определения уязвимости к болезни» (Green, Martin. — «Lancet», 1970, v. 1, p. 1104). Я доказывал, что пока еще нет оснований ставить между ними знак равенства. Bodmer (6-я сессия) в своем глубоком анализе связи между болезнью и HL-A говорил о трактовке контроля уязвимости Ig-генами. Безусловно, у человека соотношения должны быть сложны. Здесь я лишь хочу подчеркнуть роль аномальной индукции.

Вероятно, роль локуса Ig — V_H^T , сцепленного с HL-A, при болезнях в основном обусловлена аномальной индукцией. В различных работах подчеркивается связь между типом HL-A и лейкозом, лимфогранулематозом и аутоиммунными болезнями (красная волчанка, хронический гломеруло-нефрит и т. д.) (McDevitt, Bodmer. — «Am. J. Med.», 1972, v. 52, p. 1; Bodmer, 6-я сессия). Как я указывал выше, если учитывать генез генерализованного аутоиммунитета через посредство аномальной индукции, то эти данные становятся понятными. Как только вирус помещает чужеродный детерминант на t-клетку, не нарушая ее функции ассоциативного распознавания, у животного может наступить «самосаботаж», подрывая деятельность против «своего» посредством аномальной индукции. Это ведет к аутоиммунитету, который в свою очередь лишает эффективности механизм иммунного надзора или позволяет утвердиться преобразованным неопластическим клеткам. В этих условиях наибольший стимул к делению получают лимфоциты, поэтому наиболее велика вероятность вирусного или другого превращения в лимфоцитах. Отсюда преимущественная заболеваемость лимфомами и лейкозами.

Далее, вопрос о том, какой именно синдром аутоиммунитета проявится, т. е. вопрос о самой слабой ткани мишени зависит от других генетических и негенетических воздействий.

Ранним признаком каскадного развития генерализованного аутоиммунитета через аномальную индукцию должно быть появление ассоциативных и эффекторных антител (лимфоцитотоксических и опосредованных клетками) против t-клетки. Последние антитела в настоящее время могут, очевидно, быть использованы с целью очень ранней диагностики, и если это будет так, то послужат одним из параметров для сопоставлений с типом HL-A. В будущем ассоциативные антитела (идиотип и специфичность) окажутся лучшим параметром для исследования, чем сывороточные эффекторные антитела.

Из всего сказанного ясно, что в настоящее время мы вряд ли сможем что-нибудь сделать, чтобы специфически контролировать продукт Ig-генов, проявляющийся в аллеле «уязвимости» или сильного ответа. Однако, как только начинает развиваться генерализованный аутоиммунитет, мы с помощью

теории ассоциативного распознавания можем наметить точку, в которой возможно остановить каскад. Если функция ассоциативных антител блокируется (при помощи антисыворотки против них или путем подавления сигнала 2), то единственным следствием взаимодействия t- или В-клетки с антигеном будет паралич. Следовательно, восстановится нормальное состояние толерантности. Регенерация иммунной системы после установления генерализованной толерантности приведет к тому, что она сохранится. Этот принцип открывает большие надежды для борьбы с аутоиммунными болезнями и болезнями иммунных комплексов, как и для проблем трансплантации, но он не может быть использован для борьбы с лейкозом, который «избежал» иммунной системы, подорванной аномальной индукцией. Результатом блокирования функции ассоциативных антител будет толерантность к вирусу и связанным с ним чужеродным антигенам. Необходимы другие дополнительные вмешательства.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свою интерпретацию генетики я основал на двух теоретических формулах — теории соматической мутации, объясняющей происхождение разнообразия, и теории ассоциативного распознавания, объясняющей проявление разнообразия. Для того чтобы разобраться в сложном фенотипе, обусловленном простым генетическим процессом, мы должны хорошо понимать происхождение и проявление антител.

Я не сомневаюсь в том, что теория ассоциативного распознавания для различения «своего» и «чужого» в своей общей форме окажется правильной (см. рис. 82). При взаимодействии с антигеном требуются два сигнала для индукции любой антигенчувствительной клетки: один сигнал передается через ее рецептор, а другой — через ассоциативные антитела. Для паралича требуется только один сигнал, передаваемый через рецептор. Для того чтобы ассоциативные антитела функционировали как элемент, контролирующий различение «своего» и «чужого», нормальная индукция должна заключаться в совместном распознавании минимум двух детерминантов на антигене. Если этого не происходит, как при аномальной индукции, то различение «своего» и «чужого» делается невозможным и развивается аутоиммунитет. Клетка не может определить, находятся ли два детерминанта, распознаваемые соответственно рецептором и ассоциативными антителами, на одном антигене. Клетка ощущает только два сигнала, посылаемых каждым взаимодействием. Следовательно, в особых случаях, когда один сигнал посылается путем взаимодействия рецептора с антигеном, а другой — путем взаимодействия ассоциативных антител с клеточной поверхностью, наступает аномальная индукция. Это простое понятие нормальной и аномальной индукции помогает объяснить очень большое количество сложных феноменов, настолько большое, что это понятие является ценным хотя бы потому, чтобы можно было бы навести порядок в целом комплексе фактов.

Различение «своего» и «чужого» регулируется ассоциативными антителами, поэтому они, очевидно, представляют собой особый класс и вырабатываются клеткой единого происхождения. Для того чтобы уменьшить опасность аутоиммунных нарушений, ассоциативные антитела должны регулироваться на низком уровне и иметь низкую продолжительность жизни в отсутствие вырабатывающих их клеток. Напротив, эффекторные антитела, которые осуществляют все защитные функции иммунной системы, должны иметь большую продолжительность жизни и регулироваться на высоком уровне. Поэтому понятно, что, согласно экспериментальным данным, ассоциа-

тивные антитела имеют тимусное происхождение (вырабатываются t-клеткой), а эффекторные антитела — костномозговое происхождение (вырабатываются B-клеткой). Два вида антител, вероятно, являются иммуноглобулинами, имеющими одни и те же субъединицы легких цепей каппа и ламбда, кодируемыми двумя несцепленными локусами. Их особые функциональные свойства определяются субъединицей тяжелых цепей, которые у ассоциативных антител кодируются локусом $V_H^T C_H^T$, тесно сцепленным с основными генами гистосовместимости, а у эффекторных антител — несцепленным локусом $V_H^B C_H^B$, помеченным серологически распознаваемым полиморфным детерминантом (аллотипом), т. е. тест на ассоциативные антитела — это кооперативная активность при индукции, а на эффекторные антитела — это ряд специализированных активностей, например лизис комплементом или клеточная реактивность. Все классы антител, ассоциативные и эффекторные, вероятно, функционируют после секреции, наступающей вслед за индукцией антигенчувствительных клеток. Некоторые из них вооружают другие эффекторные клетки, например макрофаги, базофилы или дендритные клетки. Теория говорит нам о том, что антигенчувствительная клетка вряд ли когда-нибудь может функционировать как эффекторная, распознавая мишень через собственный рецептор.

Существуют сотни генов зародышевой линии, которые могут детерминировать отвечаемость специфическую или общую и проявляются рецессивно или доминантно. Единственный парадоксальный случай специфической доминантной отвечаемости детерминируется структурными генами зародышевой линии, которые кодируют специфичность рецепторов на антигенчувствительных клетках, ассоциативных антител на t-клетках и эффекторных антител на B-клетках. Эти гены иммунного ответа (Ig) являются V-генами, V_K , V_L , V_H^B и V_H^T . Вследствие асимметрии соотношения между t-клетками и B-клетками (t-клетка необходима для индукции t и B, но не наоборот) наиболее часто встречающиеся случаи генетически детерминированной специфической доминантной отвечаемости обусловлены локусом V_H^T , но если правильно искать, то столь же часто выявим и роль локуса V_H^B . Ценным для экспериментов является сцепление локуса Ig— V_H^T с двумя основными генами гистосовместимости (H-2K и H-2D у мыши), но, видимо, это сцепление не имеет какого-то особого функционального значения.

Генетику специфически доминантных иммунных ответов можно будет изучить, когда мы разберемся в более общем вопросе, о происхождении разнообразия. V-ген зародышевой линии, детерминирующий специфическую отвечаемость, может «установиться» в популяции благодаря тому, что роль его настолько ощущается, что селекция зародышевых линий действует в его пользу. Это позволяет предполагать минимальное количество V-генов зародышевых линий, которые селекционируются в зародышевой линии, так как они кодируют специфичности, имеющие непосредственное значение для выживаемости животного, но которые могут в дальнейшем эволюционировать в результате соматической мутации и последующей антигенной селекции.

Таким образом, согласно теории соматической мутации, общая способность животного к ответу увеличивается в процессе соматической селекции от какой-то минимальной способности, закодированной в зародышевой линии, до максимальной способности, закодированной в организме. Генетика иммунных ответов вследствие полиморфизма V-генов зародышевой линии является следствием этого процесса, так как вероятность того, что

животное сможет отвечать на данный антигенный детерминант в более или менее разумные сроки, зависит от минимального числа этапов мутации, которые отделяют соответствующие антитела от какой-либо комбинации $V_L V_H$ зародышевой линии.

Эта общая теория основана на попытке объяснить, соблюдая минимальные требования, различие «своего» и «чужого» и способность иммунной системы распознавать большое количество разных детерминантов. Она соответствует самим основам наших познаний о механизмах эволюции и проявлении генов.

Существует такое понятие: «как не следует думать об иммунной системе». Если вы будете объяснять один факт одной теории и игнорируете упомянутые выше минимальные требования, то основное происхождение, казалось бы, разнородных феноменов будет скрыто и появится специальный жаргон, который мешает нашему общению за границами наблюдений и закрывает путь к критике. Например, литература переполнена теориями индукции или толерантности, предложенными без учета того, от чего зависит выбор между ними. При отсутствии общей теории мы принимаем факты, не вдумываясь в них, или как «самоочевидные». Поэтому не приходится удивляться, что мы как наручниками прикованы к таким смутным правильным или ложным идиомам, как «тимусзависимость и тимуснезависимость», «кооперация и умерщвление — это две стороны одной и той же t-клетки»; рецепторы t-клеток «более примитивны (менее специфичны), чем рецепторы B-клеток»; «паралич опосредован исключительно эффекторными антителами»; «ассоциативное распознавание — это хелперный прием для концентрирования задержки или патологического расположения антигена» и т. д.

Я не говорю о том, верна или ошибочна данная общая теория. Теория, которую я описал, мне представляется наиболее вероятным, но не единственным решением. Я настаиваю просто на том, чтобы мы рассмотрели теорию, дающую нам возможность понять максимальное число фактов (включая различие «своего» и «чужого»), остерегаться по рациональным причинам фактов, которые мы не понимаем, и пытаться, не ограничиваясь только экспериментом, объяснить действие иммунной системы. Только благодаря этому на каждой из наших конференций нам не придется вновь и вновь решать одну и ту же основную проблему, каждый раз предстающую перед нами под различными «псевдонимами».

СОКРАЩЕНИЯ

- АЛС — антилимфоцитарная сыворотка
 АЯА — антиядерные антитела
 Аа — австралийский антиген
 ВСГ — бациллы Кальмета и Герена
 БГГ — бычий гамма-глобулин
 БСА — бычий сывороточный альбумин
 5-БДУ — 5-бромдеоксиуридин
 АМФ — 3'5'-циклический аденозинмонофосфат
 КЗЛ — клеточно-зависимый лимфолизис
 Кон-А — конканавалин А
 КРЛ — рецептор лимфоцитов для комплемента
 ДНХБ — динитрохлорбензол
 ДНФ — динитрофенил
 ПЧЗТ — повышенная чувствительность замедленного типа
 Fab — Ig-фрагмент с одним активным центром, одна легкая цепь и N-концевая половина тяжелой цепи
 F(ab)₂ — два Fab-фрагмента, связанные друг с другом
 Fc — C-концевые половины двух тяжелых цепей одной и той же молекулы иммуноглобулина
 FMR — общий антиген вирусов Friend, Moloney, Rauscher
 РТПХ — реакция трансплантат против хозяина
 Гб — гемоглобин
 H-2 — главная система антигенов гистосовместимости мыши
 HL-A — главная система лейкоцитарных антигенов человека
 ЧСА — человеческий сывороточный альбумин
 ЧГГ — человеческий гамма-глобулин
 Ig — иммуноглобулин
 IgA } — стандартная номенклатура классов глобулинов человека,
 IgG } также используется в данной книге как обозначение аналогичных белков у
 } других видов
 IgM }
 IgE }
 ИДУР — 5'-йоддиоксиуридин
 ГМ — гемоцианин моллюска
 ЛХМ — лимфоцитарный хориоменингит
 ЛА — лимфоцитарные антигены (аллогенные различия лимфоцитов)
 ВЛЛ — вирус лимфолейкоза
 ВЛА-F — вирус-помощник, который обычно действует совместно с вирусом ВООС в комплексе вируса Фрейнда
 ЛПС — липополисахарид
 ГКГ — главный комплекс гистосовместимости
 МИФ — фактор, ингибирующий миграцию
 СКЛ — смешанная культура лимфоцитов
 ЛВМ — лейкемический вирус Молони
 ПЦ — плазмоцитома
 БОК — бляшкообразующие клетки
 ФГА — фитогемагглютинин
 ПЛЛ — поли-L-лизин
 ПФ — полимеризованный флагеллин из *Salmonella adelaide*
 Поли А:У — полиадениловая кислота — полиуридиновая кислота (комплекс)
 РРД — очищенный белок культуральной жидкости *M. tuberculosis* (микобактериальный антиген)
 МЛ — митоген из лаконоса
 РОК — розеткообразующие клетки
 СОА — серологически определяемые антитела (аллогенные различия в лимфоцитах)
 ЭБ — эритроциты барана
 ВООС — вирус, образующий очаги в селезенке (часть комплекса вируса Фрейнда)
 СКВ — системная красная волчанка
 θ(тета) — изоантиген, выраженный на тимуспроисходящих лимфоцитах мыши
 ВТМ — вирус табачной мозаики
 ТНФ — тринитрофенил

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие редакторов русского издания	8
Вступление	10
Предисловие	11
Сессия 1. Место действия на клетке Ig-генов, сцепленных с гистосовместимостью	13
Сессия 2. Генетическая организация комплекса H-2 и ее связь с Ig- и MLC-генами	69
Сессия 3. Гены иммунного ответа, сцепленные с иммуноглобулиновыми аллотипами, и другие типы генов иммунного ответа	121
Сессия 4. Соотношения между генами иммунного ответа, сцепленными с гистосовместимостью, аллотипом и антигеноспецифическими рецепторами Т- и В-клеток	176
Сессия 5. Модели на животных полигенного контроля устойчивости к болезням	235
Сессия 6. Связи между типом HL-A и болезнями	285
Комментарии и оценка результатов конференции Мелвином Коном	312
Сокращения	383

ИБ № 795

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИММУННОГО ОТВЕТА.
СВЯЗЬ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К БОЛЕЗНЯМ.

Редактор *М. М. Лвербах, И. К. Егоров*. Художественный редактор *В. А. Григорьевская*
Корректор *Л. В. Петрова*. Техн. редактор *З. А. Савельева*.
Переплет художника *Е. К. Самойлова*

Сдано в набор 17/II-1977 г. Подписано к печати 15/VI-1977 г. Формат бумаги 70×100/16.
24,0 печ. л. (условных 31,20 л.) 31,06 уч.-изд. л. Бум. тип. № 2. Тираж 5000 экз.
МН-71 Цена 3 р. 60 к.

Издательство «Медицина». Москва, Петроверигский пер., 6/8

Заказ 32. Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете Совета Министров СССР по делам издательства, полиграфии и книжной торговли.
150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

Зр. 60к.

МЕДИЦИНА 1977