

ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННОЙ ПАМЯТИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ПЕРВИЧНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА

© 2010 г. О.Т. Кудяева, Е.Д. Гаврилова, О.П. Колесникова, В.А. Козлов

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия

Поступила: 17.08.2009. Принята: 25.05.2010

Введение антигена во время поздней лог-фазы или на пике первичного гуморального IgM-ответа вызывает резкий подъем количества IgM- и IgG-антителопродукторов в селезенке, но впоследствии приводит к подавлению вторичного ответа на этот антиген. Эффект показан для мышей разных генотипов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии закономерной связи интенсивности анамнестической реакции с величиной первичного гуморального ответа в ситуации резко выраженной стимуляции последующего.

Ключевые слова: стимуляция иммунного ответа, IgM-антителопродукторы, IgG-антителопродукторы, иммунная память

ВВЕДЕНИЕ

Развитие гуморального ответа зависит от множества факторов, при этом сам антиген играет триггерную роль, запуская весь каскад иммунных реакций и межклеточных взаимодействий. Тип иммунного реагирования, его динамика и выраженность зависят как от особенностей самого организма, так и от пути поступления, вида, дозировки, продолжительности персистенции и локализации антигена в организме [1, 2]. Развитие иммунного ответа не заканчивается образованием Т-эффекторов или синтезом антител, но приводит к формированию иммунной памяти, характер которой в настоящее время трудно однозначно связать с особенностями иммунного ответа на первое введение антигена. Ранее нами было показано, что индукция локальной реакции ГЗТ в период развития первичного ответа на Т-зависимый антиген оказывает супрессивное влияние на последующий анамнестический гуморальный ответ у мышей CBF₁ [3]. Возможной причиной может быть изменение цитокинового баланса в организме во время формирования иммунной памяти в связи с индукцией Th1-зависимого процесса. Однако нельзя также исключить влияние дополни-

тельного поступления самого антигена в этот период. Целью данной работы было изучить эффекты дополнительного поступления антигена в ранние сроки после иммунизации на течение первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали мышей (C57B1/6 × DBA/2)F1 и (CBA × C57BL/6)F1, самок, в возрасте 2 месяцев, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (г. Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Мышей иммунизировали внутривенно (в/в) субоптимальной дозой Т-зависимого антигена — эритроцитами барана (1×10^7 ЭБ). Величину первичного гуморального иммунного ответа определяли путем подсчета количества IgM- и IgG-антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в селезенке мышей на пике иммунного ответа (через 5 суток для IgM-ответа и через 9 суток для IgG-ответа). Для развития локального клеточно-опосредованного ответа через 4 суток после иммунизации вводили ЭБ (5×10^8 ЭБ) под

апоневроз задней лапки; через 24 часа оценивали выраженность реакции ГЗТ по величине опухоли лапки.

Для изучения эффектов поступления дополнительного количества антигена антиген вводили через 4 суток под апоневроз задней лапки (5×10^8 ЭБ) или в/в в дозе (1×10^7 ЭБ). Через сутки после этого оценивали в селезёнке количество IgM-АОК (т.е. через 5 суток после иммунизации), через 5 суток — количество IgG-АОК (т.е. через 9 суток после иммунизации). Отдельной группе животных через месяц вводили в/в 2×10^8 ЭБ для оценки количества IgG-АОК в селезёнке на пике вторичного ответа (через 4 суток после иммунизации).

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$ (*достоверные отличия между опытной и контрольной группами, #достоверные отличия между опытными группами).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами было показано, что введение разрешающей дозы антигена под апоневроз задней лапки ранее сенсibilизированным мышам высокоотвечающего на ЭБ генотипа СВF1 в дальнейшем приводит к подавлению вторичного гуморального ответа [3]. Учитывая существование генетических особенностей иммунного реагирования, для подтверждения феномена супрессии анамнестической реакции в данной модели было изучено развитие вторичного ответа по такой же схеме у мышей другого генотипа — BDF1. Полученные данные подтверждают, что введение под апоневроз лапки разрешающей дозы антигена во время развития первичного гуморального ответа вызывает подавление последующего вторичного иммунного ответа: количество IgG-АОК в селезёнке мышей BDF1 на пике вторичного ответа снижается на 45% ($p < 0,05$).

Для решения вопроса, какой фактор является причиной супрессии вторичного иммунного ответа — формирование локальной клеточной реакции в период образования клеток памяти или само по себе дополнительное поступление антигена в это время, мы исследовали эффекты повторного введения антигена на начальных стадиях формирования иммунной реакции. Так как повторное введение антигена осуществлялось в ранние сроки после

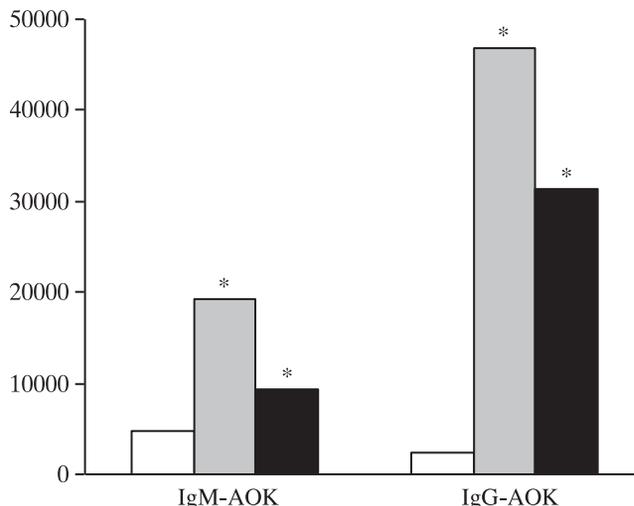


Рис. 1. Уровень первичного ответа при дополнительном поступлении антигена в конце лог-фазы IgM-ответа у мышей BDF₁.

По оси ординат — количество АОК в селезенке
По оси абсцисс — группы экспериментальных животных:

белые столбцы — контрольная группа без дополнительного введения антигена ($n = 10$ для IgM-АОК и $n = 11$ для IgG-АОК);

серые столбцы — опытная группа с повторным введением антигена внутривенно в дозе 1×10^7 ЭБ ($n = 10$ для IgM-АОК и $n = 9$ для IgG-АОК);

чёрные столбцы — опытная группа с повторным введением антигена под апоневроз в дозе 5×10^8 ЭБ ($n = 10$ для IgM-АОК и $n = 10$ для IgG-АОК).

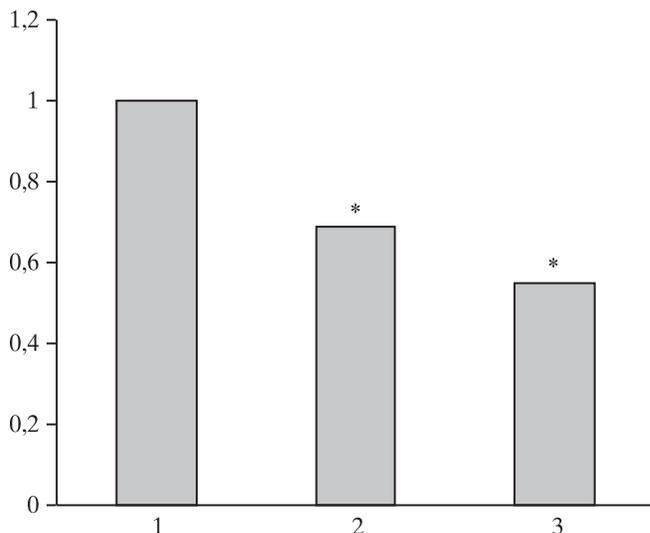


Рис. 2. Уровень вторичного ответа при дополнительном поступлении антигена в конце лог-фазы первичного IgM-ответа у мышей BDF₁.

По оси ординат — количество IgG-АОК на селезенку относительно контроля

По оси абсцисс — группы экспериментальных животных:

1 — контрольная группа без дополнительного введения антигена ($n = 24$);

2 — опытная группа с повторным введением антигена внутривенно в дозе 1×10^7 ЭБ ($n = 26$);

3 — опытная группа с повторным введением антигена под апоневроз в дозе 5×10^8 ЭБ ($n = 25$).

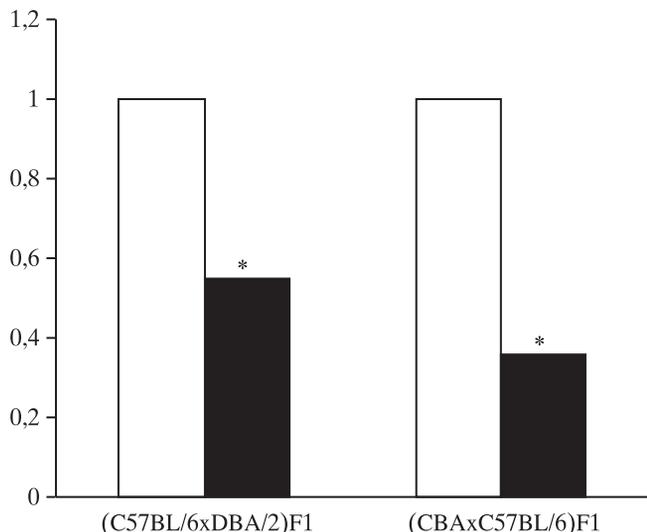


Рис. 3. Уровень вторичного ответа при введении разрешающей дозы под апоневроз через 4 суток после первой иммунизации у мышей разных генотипов.

По оси ординат — количество IgG-АОК на селезенку относительно контроля

По оси абсцисс — группы экспериментальных животных:

белые столбцы — контрольная группа без дополнительного введения антигена (n = 24 для C57BL/6xDBA/2)F1 и n = 9 для CBAxС57BL/6)F1);

черные столбцы — опытная группа с повторным введением антигена под апоневроз в дозе 5×10^8 ЭБ (n = 25 для C57BL/6xDBA/2)F1 и n = 10 для CBAxС57BL/6)F1).

иммунизации, в период, когда развивается первичный иммунный ответ, мы также сравнили эффекты разных способов введения антигена — внутривенно или под апоневроз

на развитие первичного IgM- и IgG-ответа. Мышам BDF1, первично иммунизированным внутривенно субоптимальной дозой антигена, дополнительно вводили через 4 суток антиген под апоневроз (для индукции локальной реакции ГЗТ) или внутривенно. В последнем случае использовали субоптимальную дозу (1×10^7 ЭБ), чтобы исключить или хотя бы уменьшить вероятность развития системной реакции ГЗТ, что может иметь место при внутривенном способе введения антигена [4, 5].

Как следует из данных, представленных на рисунке 1, при том и другом пути поступления дополнительного количества антигена наблюдается резкая стимуляция первичного IgM- и IgG-ответа, при этом число IgM- и IgG-АОК в селезенке достигает уровня ответа на оптимальную дозу антигена. Уровень вторичного ответа оказывается подавленным (рис. 2), при этом эффект также не зависит от способа введения антигена — внутривенно или под апоневроз.

Эффект дополнительного введения антигена во время развития первичного ответа (через 4 суток после иммунизации) на формирование иммунной памяти у мышей CBF1 имел более выраженный характер, чем у мышей BDF1 (рис. 3). Мыши CBF1 относятся к высокоотвечающему на ЭБ генотипу; максимальное количество IgM-АОК в селезенке наблюдается у них через 4 суток после иммунизации, то есть повторное введение антигена в наших опытах приходилось на пик IgM-ответа. У мы-

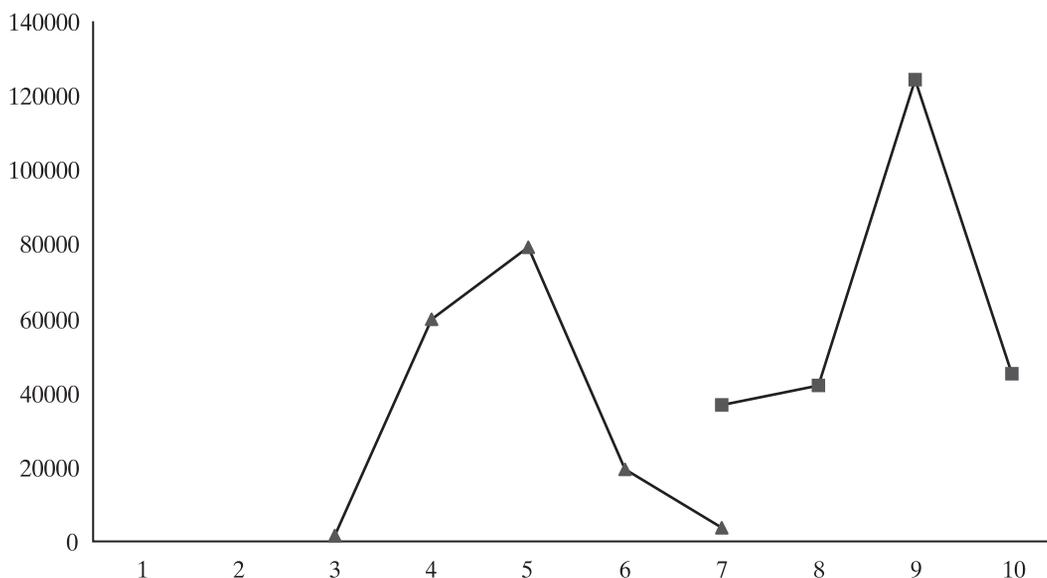


Рис. 4. Динамика первичного ответа у мышей BDF1.

По оси ординат — количество АОК на селезенку

По оси абсцисс — дни после введения антигена

Обозначения: треугольники — IgM-АОК; квадраты — IgG-АОК.

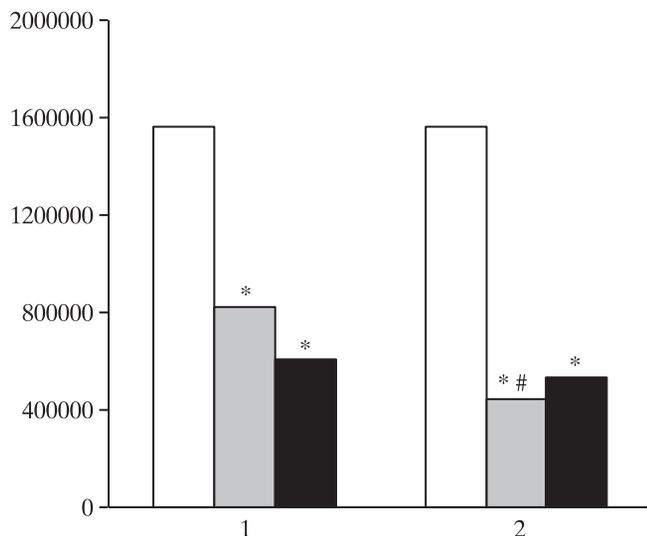


Рис. 5. Уровень вторичного ответа при дополнительном поступлении антигена в период формирования первичного IgM-ответа у мышей BDF₁.

По оси ординат — количество IgG-АОК на селезенку
По оси абсцисс — группы экспериментальных животных:

1 — введение дополнительного количества антигена через 4 суток после иммунизации;

2 — введение дополнительного количества антигена через 5 суток после иммунизации

Обозначения:

белые столбцы — контрольная группа без дополнительного введения антигена ($n = 9$ для 1 и $n = 9$ для 2);

серые столбцы — опытная группа с повторным введением антигена внутривенно в дозе 1×10^7 ЭБ ($n = 10$ для 1 и $n = 10$ для 2);

чёрные столбцы — опытная группа с повторным введением антигена под апоневроз в дозе 5×10^8 ЭБ ($n = 10$ для 1 и $n = 9$ для 2).

шей BDF₁ первичный ответ развивается медленнее и максимальное количество IgM-АОК в селезёнке определяется через 5 суток после иммунизации, в то же время пик первичного IgG-ответа у мышей BDF₁ и CBF₁ совпадает по времени и наступает через 9 суток после иммунизации (рис. 4). Выраженность реакции ГЗТ при введении разрешающей дозы через 4 или 5 суток у мышей BDF₁ не различается между собой и равна 43,4% ($n = 9$) и 43,8% ($n = 9$), соответственно ($p > 0,05$).

Так как степень ингибирующего эффекта, возможно, зависит от фазы ответа, во время которой происходит дополнительное поступление антигена, мы сравнили влияние повторного введения антигена в разные периоды формирования первичного IgM-ответа у мышей BDF₁ — через 4 суток, то есть в конце лог-фазы, и через 5 суток, на пике IgM-ответа. Результаты представлены на рисунке 5. Действительно, введение дополнительного коли-

чества антигена на пике первичного IgM-ответа подавляет развитие вторичного ответа у мышей BDF₁ в большей степени.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на огромные успехи в понимании тонких механизмов регуляции синтеза антител в процессе развития гуморального ответа и характеристике отдельных субпопуляций клеток памяти среди основных участников специфического иммунного ответа (CD8⁺, CD4⁺- и В-лимфоцитов), закономерности формирования анамнестического ответа на уровне целостного организма в настоящее время ещё далеки от разрешения [6, 7]. Так, известно, что вторичный ответ на низкие дозы характеризуется большей аффинностью образующихся антител; уровень вторичного ответа поднимается при повторных многократных введениях антигена; однако не установлено чётких и однозначных закономерностей развития вторичного ответа в связи с выраженностью первичного IgM- или IgG-ответа.

Как следует из полученных нами результатов, повторное введение антигена через 4 суток после иммунизации приводит к резкому увеличению количества как IgM-, так и IgG-антителопродукторов при первичном ответе. Напротив, вторичный IgG-ответ у таких животных не только не стимулируется, но оказывается подавленным. Мыши разных генотипов (CBA \times C57BL/6)F₁ и (C57B1/6 \times DBA/2)F₁ обнаруживают одинаковую закономерность подавления анамнестической реакции при резкой стимуляции первичного ответа, отличие проявляется лишь в выраженности супрессии.

Эффект подавления вторичного ответа при введении разрешающей дозы антигена (и, как следствие, при развитии реакции ГЗТ) аналогичен таковому при внутривенном введении субоптимальной дозы антигена, что с большей вероятностью свидетельствует о влиянии дополнительного поступления антигена, нежели о влиянии развивающегося клеточно-опосредованного Th1-зависимого процесса на формирование иммунной памяти. В пользу данной трактовки говорит и то, что в этих условиях наблюдается резкая стимуляция первичного гуморального ответа, тогда как при действии на системном уровне факторов, сопровождающих развитие ГЗТ как Th1-зависимого процесса, скорее было бы ожидать

снижения числа IgM- и IgG-антителопродуцентов.

При первичном ответе антиген-специфические В-клетки после контакта с антигеном и Th2-клетками активируются к пролиферации и дифференцировке в антителопродуценты, причём до стадии плазматической клетки эти процессы идут параллельно [8, 9]. В дальнейшем происходят такие события, как образование коротко- и долгоживущих плазматических клеток и клеток памяти, которые также представляют гетерогенную популяцию, а также миграция клеток в костный мозг и резкое снижение количества антителопродуцентов в результате апоптоза. На вторичное введение антигена через 3–4 недели, когда развитие первичного ответа завершено, реагируют антигенспецифические Т- и В-клетки-памяти, при этом ответ формируется в значительно более сжатые сроки [10–13].

В-клетки, отвечающие на Т-зависимый антиген, могут дифференцироваться в плазматические клетки либо в экстрафолликулярных зонах, либо в герминальных центрах, где в последнем случае в них происходят такие процессы, как соматический гипермутационез и созревание аффинности синтезируемых антител. Физиологические сигналы, направляющие В-клетку по одному из этих путей, в настоящее время чётко не определены. Предполагается, что одним из факторов, влияющих на выбор пути дифференцировки антиген-специфических В-лимфоцитов, является сила начального взаимодействия В-клеточно-рецептора и антигена [14].

Повторное введение антигена в конце лог-фазы или на пике первичного IgM-ответа может вызывать дополнительную стимуляцию антиген-презентирующих клеток и/или Th-клеток и, таким образом, влиять на различные процессы формирующегося иммунного ответа: снижать апоптоз антителопродуцентов, усиливать их пролиферативную активность, тормозить миграцию долгоживущих плазматических клеток и клеток-памяти в костный мозг, изменять соотношение образующихся антителопродуцентов и клеток памяти. Так, стимуляция АПК под влиянием вновь поступившего антигена может вызывать дополнительную секрецию IL-12. Продукция этого цитокина, играющего центральную роль в клеточно-опосредованных воспалительных реакциях через прямое связывание с Т- и НК-клетками, в основном связана с развитием Th1-зависимых клеточных реакций, одна-

ко его действие не ограничивается активацией Т-клеток. IL-12 также существенно влияет на гуморальный иммунный ответ, хотя, по большей части, его эффекты опосредованы в этом случае другими цитокинами. Однако рецепторы к IL-12 представлены также и на В-лимфоцитах человека и мыши. У мыши IL-12 может прямо взаимодействовать с перитонеальными В1-лимфоцитами и активированными ЛПС В-клетками селезёнки [15]. Более того, показано, что IL-12 может менять баланс между антиген-специфическими В-клетками, дифференцирующимися в антителопродуценты или клетки-памяти, стимулируя образование короткоживущих антителообразующих клеток, которые остаются в селезёнке, в отличие от прошедших через герминальные центры долгоживущих плазматических клеток, мигрирующих в костный мозг [16]. Дифференцировка В-клеток в клетки-памяти является IL-12-независимой [17]. Таким образом, IL-12, вызывающий преимущественную генерацию короткоживущих селезёночных клеток с низкой аффинностью, снижает анамнестический ответ [16].

В использованной нами схеме опыта – повторное введение антигена в ранние сроки развития первичного гуморального ответа – антиген может действовать непосредственно или образуя иммунные комплексы со специфическими IgM-антителами, которые продуцируются в этот период уже в достаточном количестве и, как известно, приводят к стимуляции первичного ответа [18].

В настоящее время считается, что формирование иммунной памяти не обнаруживает однозначных связей с выраженностью первичного ответа. Отсутствие чёткой корреляции между уровнем первичного и вторичного ответа, выявленное при использовании разных доз антигена на животных разных видов, свидетельствует, что для образования пула клеток памяти и/или долгоживущих плазматических клеток достаточно минимального антигенного стимула, который является пусковым сигналом достаточно жёстко закреплённых процессов формирования иммунной памяти. Первичный как IgM-, так и IgG-ответ, который определяется деятельностью короткоживущих антителопродуцентов, более подвержен влиянию регулирующих факторов. Показанная в настоящем исследовании обратная зависимость между уровнями первичного и вторичного ответа на антиген демонстрирует наличие закономерной связи интенсив-

ности анамнестической реакции с величиной первичного IgM- и IgG-ответа в ситуации резкой выраженной стимуляции последнего.

Закономерности соотношения первичного и вторичного ответа могут иметь значение для выбора оптимальных доз и схем введения антигенов при вакцинациях и технологическом получении специфических антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zinkernagel R.M., Ehl S., Aichele P., Oehen S., Kundig T. et al. Antigen localization regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Rev.* 1997, 156, 199 – 209.
2. Гольдберг И.Д., Машная Н.В., Шурип А.А. Иммунологические параметры мышей различных линий. *Бюл. Экспер. Биол. Мед.* 2005, 2, 219 – 221.
3. Гаврилова Е.Д., Кугаева О.Т., Колесникова О.П. Регуляторные взаимодействия между клеточным и гуморальным ответом при формировании иммунной памяти. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2006, 3 – 1 (14), 32 – 35.
4. Вассали П., Мак-Класки Р. Гиперчувствительность замедленного типа. В кн.: Воспаление, иммунитет и гиперчувствительность. Медицина, Москва 1975, 169 – 219.
5. Медуницын Н.В. Повышенная чувствительность замедленного типа. Медицина, Москва 1983, 160.
6. McHeyzer-Williams L.J., Maherbe L.P., McHeyzer-Williams M.G. Checkpoints in memory B-cell evolution. *Immunol. Rev.* 2006, 211, 255 – 268.
7. Lefrancois L. Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets. *Immunol. Rev.* 2006, 211, 93 – 103.
8. Tange S.G., Hodgkin P.D. Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B-cell responses. *Immunol.* 2004, 112, 509 – 520.
9. Van Zelm M.C., van der Burg M., van Dongen J.J.M. Homeostatic and maturation-associated proliferation in the peripheral B-cell compartment. *Cell Cycle* 2007, 6, 2890 – 2895.
10. Hentges F. B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin. Exp. Immunol.* 1994, 97(S.1), 3 – 9.
11. McHeyzer-Williams L.J., Cool M., McHeyzer-Williams M.G. Antigen-specific B-cell memory: expression and replenishment of a novel B220-memory B cell compartment. *J. Exp. Med.* 2000, 191, 1149 – 1165.
12. Tarlinton D., Radbruch A., Hiepe F., Dorner T. Plasma cell differentiation and survival. *Current Opinion in Immunology* 2008, 20, 162 – 169.
13. Batista F.D., Harwood N.E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews. Immunology* 2009, 9, 15 – 27.
14. Paus D., Phan T.G., Chan T.D., Gardam S., Basten A. et al. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cells and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* 2006, 203, 1081 – 1091.
15. Vogel L.A., Showe L.C., Lester T.L., McNutt M., Van Cleave V.H. et al. Direct binding of IL-12 to human and murine B lymphocytes. *International Immunol.* 1996, 8, 1955 – 1962.
16. Kim S.J., Caton M., Wang C., Khalil M., Zhou Z.J. et al. Increased IL-12 inhibits B cells' differentiation to germinal center cells and promotes differentiation to short-lived plasmablasts. *J. Exp. Med.* 2008, 205, 2437 – 2448.
17. Dubois B., Massacrier C., Vandervliet B., Fayette J., Briere F. et al. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naïve B lymphocytes. *J. Immunol.* 1998, 161, 2223 – 2231.
18. Hjelm F., Carlsson F., Getahun A., Heyman B. Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scand. J. Immunol.* 2006, 64, 177 – 184.

THE FORMATION OF IMMUNE MEMORY UNDER THE STIMULATION OF PRIMARY ANTIBODY RESPONSE

O.T. Kudaeva, E.D. Gavrilova, O.P. Kolesnikova, V.A. Kozlov

Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

The injection of antigen at the late log-phase or the peak time-point of the first-set antibody response causes the sharp increase of IgM- and IgG-AFC number in spleen but subsequently results in suppression of the same antigen second-set antibody response. This effect is demonstrated with mice of various genotypes. These experimental data points to the fact that the regular relation of the secondary antibody response level with the primary antibody magnitude exists in the case of the marked stimulation of one.