

СТИМУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА: РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ИНГИБИТОРАМ ПРОЛИФЕРАЦИИ

Е.Д.Гаврилова, О.Т.Кудаева, О.П.Колесникова, В.А.Козлов

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Дополнительное поступление антигена в конце лог-фазы развивающегося IgM-ответа на T-зависимый антиген приводит к резкому возрастанию количества IgM- и IgG-антителообразующих клеток в селезенке экспериментальных животных. Эффект дозозависим и более выражен при первичной иммунизации субоптимальной дозой антигена. Элиминация пролиферирующих в этот период антителопродуцентов оказывает неоднозначный эффект на IgM- и IgG-антителообразование в селезенке: ограничивает подъем IgM-антителообразующих клеток, но не отменяет стимуляцию IgG-ответа. Предполагается, что увеличение количества IgG-антителопродуцентов не связано с активно пролиферирующими в этот период клетками-предшественниками IgG-антителообразующих клеток.

Ключевые слова: пролиферативная активность антителопродуцентов, IgM- и IgG-антителообразующие клетки, гидроксимочевина

Несмотря на успехи в понимании клеточных и молекулярно-генетических механизмов синтеза антител, существует много невыясненных вопросов регуляции гуморального иммунного ответа на уровне целого организма [2-4]. Ранее нами показано, что дополнительное поступление антигена в лог-фазу развивающегося первичного гуморального иммунного ответа на T-зависимый антиген снижает выраженность вторичного ответа у мышей (CBA×C57Bl/6) F_1 [1]. Целью данной работы было исследовать подобные эффекты повторного введения антигена на формирование первичного IgM- и IgG-ответа.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали мышей-самок (C57Bl/6×DBA) F_1 в возрасте 2-3 мес, полученных из Экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Мышей иммунизировали внутривенно эритроцитами барана (ЭБ) в субоптимальной (1×10^7) и

оптимальной (2×10^8) дозах. Величину гуморального иммунного ответа определяли путем подсчета количества IgM- и IgG-антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в селезенке мышей на пике иммунного ответа. В предварительных экспериментах определяли динамику иммунного ответа для мышей данного генотипа: максимальное количество IgM-АОК в селезенке наблюдается через 5 сут, IgG-АОК — через 9 сут после иммунизации.

Повторное введение антигена проводили также в субоптимальной (1×10^7) и оптимальной (2×10^8) дозах ЭБ внутривенно за 1 сут до пика ответа: через 4 сут для оценки IgM-ответа, через 4 или 8 сут — для оценки IgG-ответа.

Для элиминации пролиферирующих клеток животным, предварительно иммунизированным субоптимальной дозой, вводили гидроксимочевину (ГМ) через 4 сут после первичной иммунизации двукратно с интервалом 7 ч из расчета 1 г/кг.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики; различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Повторное введение антигена в позднюю лог-фазу первичного IgM-ответа (через 4 сут после им-

мунизации) оказывало стимулирующее влияние на развивающийся первичный IgM- и IgG-ответ в селезенке (рис. 1, 2). Увеличение количества АОК было более выражено при использовании для первичной иммунизации субоптимальной дозы антигена и при повторном введении большей дозы антигена. При первичной иммунизации оптимальной дозой антигена количество IgM-АОК возрастало, но только при повторном введении также большой дозы антигена; уровень IgG-АОК не менялся. Отсутствие выраженной стимуляции антителообразования

повторным введением антигена при иммунизации большими дозами было показано ранее [3].

Можно предположить, что повторное введение антигена в конце лог-фазы первичного IgM-ответа вызывает пролонгацию активации начальных стадий ответа, что приводит к изменению физиологического течения гуморального ответа.

Дополнительное введение антигена в конце лог-фазы первичного IgG-ответа (через 8 сут после иммунизации) не приводит к подобному эффекту: количество IgG-АОК не меняется; более того, при использовании низкой дозы антигена и для иммунизации, и для повторного введения число IgG-АОК даже достоверно снижается (рис. 2).

Различие в ответе на повторное введение антигена через 4 и 8 сут может быть связано с регулирующим влиянием антител разных классов. Повторное введение антигена через 4 сут происходило на фоне активной продукции специфических IgM, а через 8 сут — специфических IgG. Антитела класса IgM, введенные вместе с корпускулярным антигеном, стимулируют гуморальный иммунный ответ, тогда как антитела класса IgG — подавляют его; эффект показан как для пассивно введенных, так и для образующихся в организме антител [5].

При первичном ответе антигенспецифические В-клетки после контакта с антигеном и Th2-клетками активируются к пролиферации и дифференцировке в АОК, причем до стадии плазматической клетки эти процессы идут параллельно [6,8]. В дальнейшем происходят переключение изотипов иммуноглобулина, образование коротко- и долгоживущих плазматических клеток и клеток памяти, миграция клеток в костный мозг и резкое снижение количества АОК [2-4,7]. Часть этих процессов изучена достаточно хорошо, детальная картина и

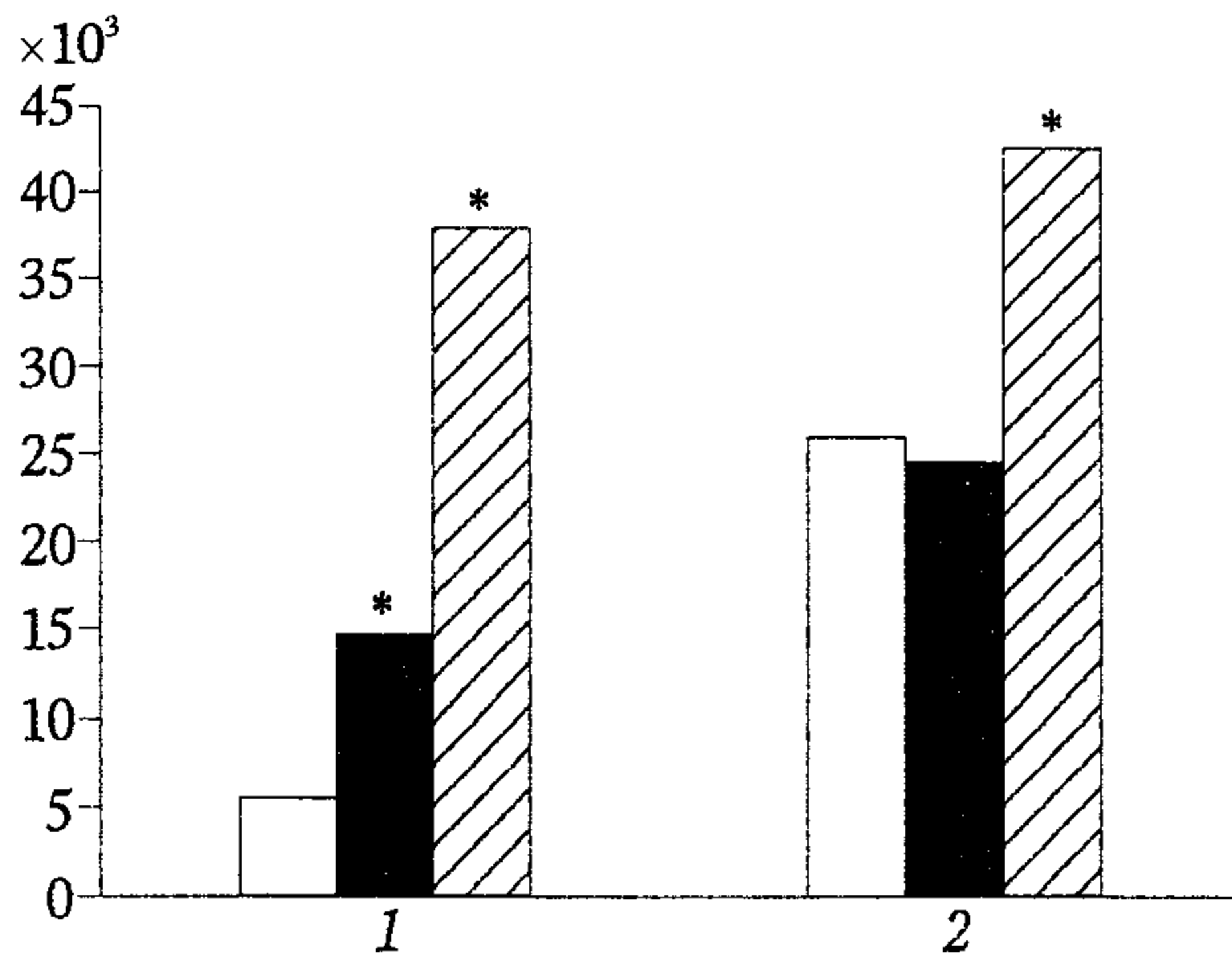


Рис. 1. Количество IgM-АОК в селезенке мышей при повторном введении антигена через 4 сут после иммунизации.

Здесь и на рис. 2: светлые столбики — контроль (без дополнительного введения антигена); темные — опытная группа с повторным введением антигена в дозе 1×10^7 ЭБ; заштрихованные — опытная группа с повторным введением антигена в дозе 2×10^8 ЭБ. Доза первичной иммунизации ЭБ — 1×10^7 (1) и 2×10^8 (2).

Здесь и на рис. 2, 3: * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

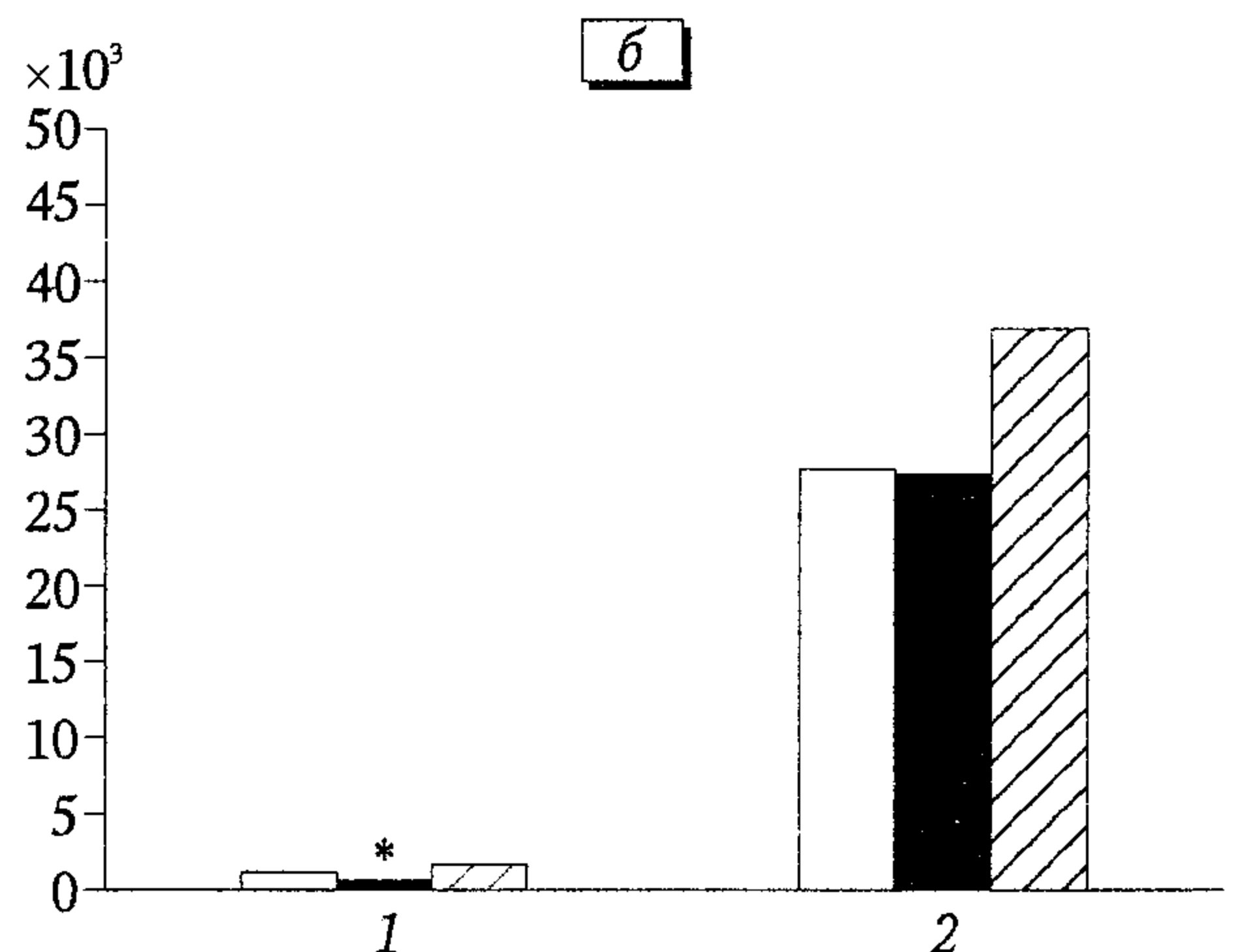
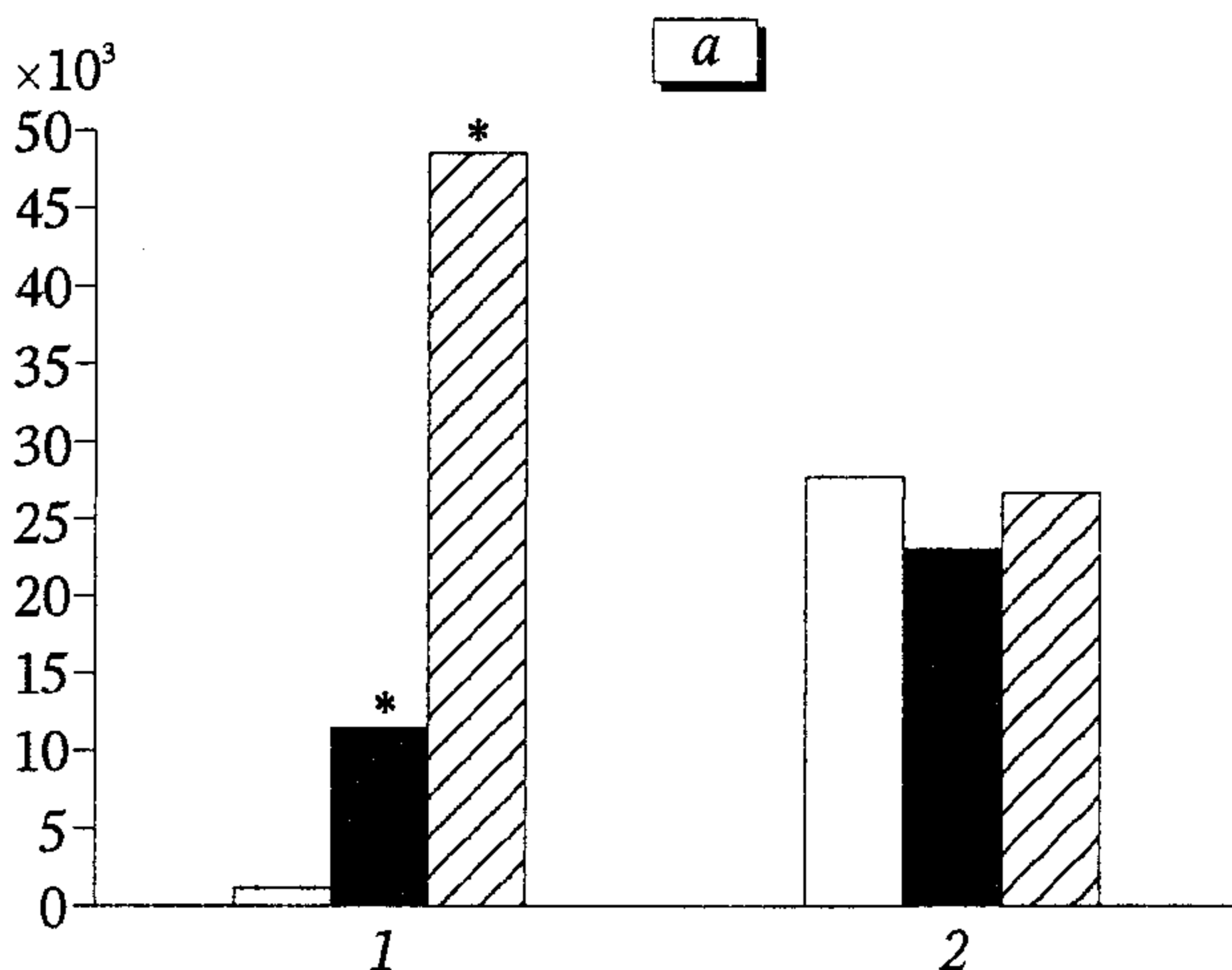


Рис. 2. Количество IgG-АОК в селезенке мышей при повторном введении антигена через 4 сут (а) и 8 сут (б) после иммунизации.

регулирующие факторы других остаются во многом не ясными.

Увеличение количества АОК при повторном введении антигена в конце лог-фазы оказывается очень резким, особенно для IgG-АОК (более чем на порядок). В случае IgM-ответа многократное (от 3 до 7 раз при первичной иммунизации субоптимальной дозой) увеличение числа клеток, продуцирующих специфические антитела, происходит в достаточно краткий период — 1 сут. Такие эффекты предполагают участие мощных регуляторных факторов. Одним из механизмов реализации их действия может быть стимуляция пролиферативных процессов В-лимфоцитов, дифференцирующихся в АОК.

Для изучения роли пролиферативных процессов в стимулирующем эффекте дополнительного поступления антигена была проведена серия экспериментов с введением ГМ — ингибитора синтеза ДНК. При введении ГМ мышам в лог-фазу первичного IgM-ответа (через 3 или 4 сут после иммунизации) наблюдалось выраженное подавление продукции IgM- и IgG-антител в полном соответствии с известной схемой развития гуморального иммунного ответа (введение ГМ через 3 сут подавляло на 86% IgM-ответ и на 77% — IgG-ответ в контрольной группе; данные по введению ГМ через 4 сут представлены на рис. 3). Введение ГМ через 4 сут после иммунизации одновременно с повторным введением антигена вызывало ослабление стимулирующего эффекта в случае IgM-ответа, хотя количество IgM-АОК в селезенке оставалось на достаточно высоком уровне, сравнимом с таковым в контрольной группе мышей, которых иммунизи-

ровали, но не подвергали дальнейшим воздействиям (рис. 3). Таким образом, большая часть IgM-АОК при стимуляции повторным введением антигена представлена активно пролиферирующими клетками, при этом можно предположить как некоторое сокращение продолжительности клеточного цикла, так и сдерживание выхода клеток из делящегося пула. Однако определенная часть IgM-АОК при этом оказывается принадлежащей к неделящейся популяции, что свидетельствует о существовании и других механизмов реализации стимулирующего влияния антигена, кроме усиления пролиферации АОК. Возможно, при стимуляции в ответ вовлекаются клетки, которые без стимуляции менее интенсивно продуцируют антитела, что не позволяет определить их стандартными методами. Повторное введение антигена, опосредуемое вероятным изменением продукции цитокинов антигенпрезентирующими и/или Th-клетками, может усиливать в них процессы биосинтеза антител. Это также могут быть клетки, которые при однократной иммунизации в этот период подвергаются апоптозу; повторное введение антигена может обеспечивать их сигналами для выживания [4,7].

Определение количества IgG-АОК в использованной нами схеме опыта не выявило отмены или снижения стимулирующего эффекта повторного введения антигена. Увеличение числа IgG-АОК в селезенке по-прежнему характеризуется резким, более чем 10-кратным подъемом (рис. 3). Можно предположить, что при повторном введении антигена в активную пролиферацию вовлекаются клетки-предшественники IgG-АОК, которые до этого не входили в пролиферирующий в этот период пул; со-

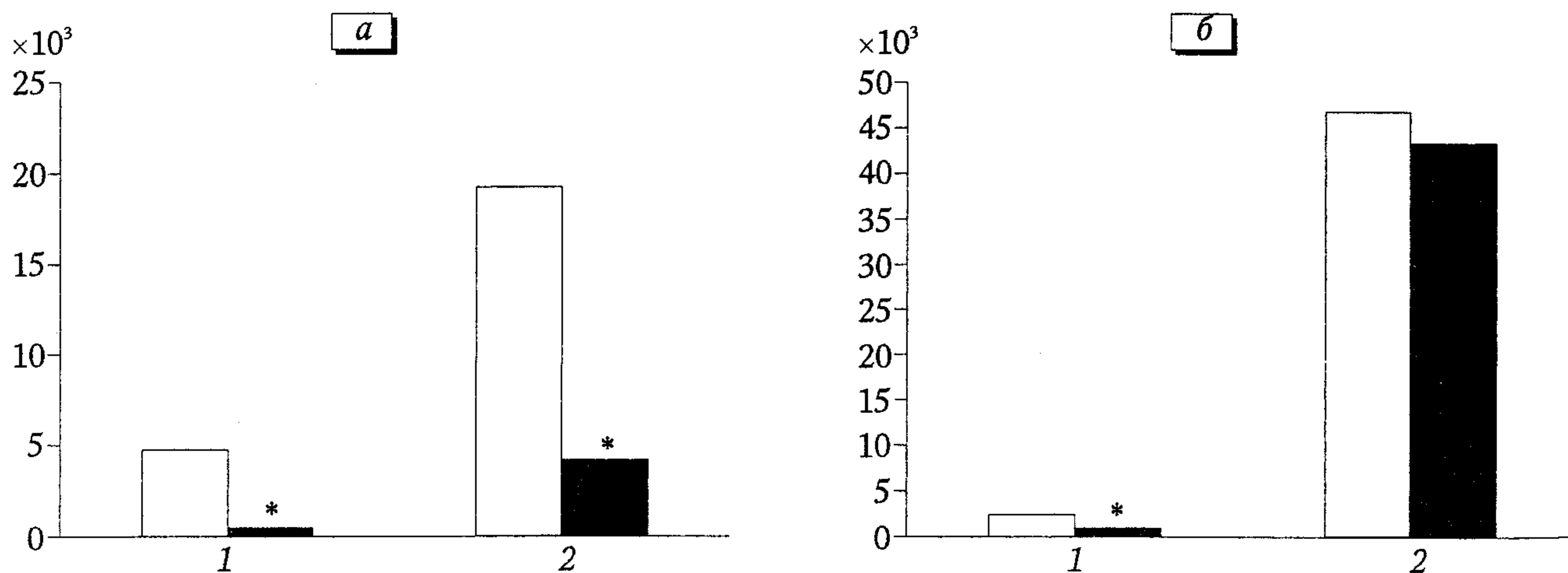


Рис. 3. Количество IgM-АОК (а) и IgG-АОК (б) в селезенке мышей BDF1 при повторном введении антигена через 4 сут после иммунизации на фоне введения ГМ.

1 — контрольная группа без дополнительного введения антигена; 2 — опытная группа с дополнительным введением антигена в дозе 1×10^7 ЭБ.

Светлые столбики — без введения ГМ; темные — с введением ГМ.

ответственно, их пролиферация начинается позднее и не подавляется ГМ.

Повторное введение антигена в конце лог-фазы развивающегося IgM-ответа также может изменять процессы миграции клеток (усиливать поступление клеток в селезенку из костного мозга и периферии, а в дальнейшем, при развитии IgG-ответа, тормозить уход АОК в костный мозг), а также соотношение АОК/клетки памяти при дифференцировочных процессах; эти возможные механизмы требуют дальнейшего исследования.

Таким образом, дополнительное введение антигена в конце лог-фазы первичного IgM-ответа приводит к выраженной стимуляции пролиферативной активности IgM-АОК и значительному возрастанию их количества. Параллельно с этим наблюдается резкое увеличение числа IgG-АОК. Торможение процессов пролиферации на фоне стимуляции первичного ответа (введение ГМ одновременно с введением антигена во время лог-фазы первичного IgM-ответа) снижает подъем IgM-АОК, но не отменяет стимуляцию образования IgG-АОК, что предполагает участие в последнем случае клеток, не

входящих в пул активно пролиферирующих в этот период АОК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова Е.Д., Кудаева О.Т., Колесникова О.П. // Вестн. Урал. мед. академической науки. 2006. № 3-1. С. 32-35.
2. Batista F.D., Harwood N.E. // Nat. Rev. Immunol. 2009. Vol. 9, N 1. P. 15-27.
3. Cahalan M.D., Parker I. // Semin. Immunol. 2005. Vol. 17, N 6. P. 442-451.
4. Crowley J.E., Scholz J.L., Quinn W.J. 3rd et al. // Immunol. Res. 2008. Vol. 42, N 1-3. P. 75-83.
5. Hjelm F., Carlsson F., Getahun A., Heyman B. // Scand. J. Immunol. 2006. Vol. 64, N 3. P. 177-184.
6. Tangye S.G., Hodgkin P.D. // Immunology. 2004. Vol. 112, N 4. P. 509-520.
7. Tarlinton D., Radbruch A., Hiepe F., Dörner T. // Curr. Opin. Immunol. 2008. Vol. 20, N 2. P. 162-169.
8. van Zelm M.C., van der Burg M., van Dongen J.J. // Cell Cycle. 2007. Vol. 6, N 23. P. 2890-2895.

Получено 15.07.09