

На правах рукописи



ГАВРИЛОВА
Елена Давидовна

**АНТИГЕН-ИНДУЦИРОВАННЫЕ РЕАКЦИИ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ПАМЯТИ
В НОРМЕ И ПРИ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ**

14.03.09 - Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск-2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук научно-исследовательском институте клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН.

Научный руководитель:
доктор биологических наук

Жудаева Ольга Тимофеевна

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук, профессор
кандидат биологических наук, профессор

Останин Александр Анатольевич
Попова Нэлли Александровна

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (117997, г. Москва, ул. Остроумова, д. 1).

Защита состоится «19» января 2012 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 НИИ Клинической Иммунологии СО РАМН по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ Клинической иммунологии СО РАМН

Автореферат разослан « 2 » декабря 2011г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук



Колесникова Ольга Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Формирование иммунного ответа на конкретный антиген, тип иммунного реагирования, его динамика и выраженность определяется как «географией» антигена [Zinkernagel R.M et al., 1997], то есть путем поступления, дозой, продолжительностью персистенции и локализацией антигена в организме, так и особенностями самого организма, включая его текущее состояние [Gonzalez S.F. et al 2010; Pereira J.P. et al, 2010].

Развитие иммунного ответа не заканчивается образованием Т-эффекторов или синтезом антител, но и вызывает формирование иммунной памяти [Vitetta E.S. et al, 1991; Batista F.D. et al, 2009; Obar J.J. et Lefrançois L., 2010; Marelli-Berg F.M. 2010], характер которой зачастую трудно связать с особенностями иммунного ответа на первое введение антигена. Наблюдаемые при вторичном ответе реакции, как правило, не удается предсказать, исходя из предполагаемых в соответствии с известными закономерностями событий. Так, например, установлено [Swain S.L. et al., 2006], что выраженный гуморальный вторичный ответ часто наблюдается при первичной иммунизации низкими дозами антигена, а увеличение дозы приводит к парадоксальному снижению анамнестической реакции

Несмотря на огромные успехи в понимании тонких молекулярно-генетических механизмов регуляции синтеза антител и переклечения классов и подклассов иммуноглобулинов в процессе развития гуморального ответа [Ada G.L. et Blanden R.V. 1994; Dooms H. et Abbas A., 2006; Fearon D.T et al, 2006], выделении и характеристике многочисленных отдельных субпопуляций клеток памяти среди основных участников специфического иммунного ответа (Т-лимфоцитов: CD8⁺, CD4⁺ и В-лимфоцитов) [Ада Г., Рамсей А. 2002; Lefrancois L., 2006; Calame K., 2006, Jameson S.C. et Masopust D., 2009], их роль и закономерности регуляции, а также взаимоотношения первичного и вторичного гуморального иммунного ответа и баланс клеточного и гуморального звеньев при вторичном ответе на уровне целостного организма в настоящее время ещё далеки от разрешения [Ahmed R. et Rouse B.T., 2006, Blanchard-Rohner G. et al, 2009].

Представляется вероятным, что формирование иммунной памяти при различных иммунопатологических состояниях отличается от этих процессов в норме. Известно, что индукция хронической РТПХ приводит к развитию аутоиммунной патологии, которая по клиническим и патоморфологическим признакам аналогична СКВ человека [Via C. S. et al. 1988, Kuzmina Z. et al, 2011]. При изучении иммунокомплексного гломерулонефрита, развивающегося при индукции хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) была обнаружена супрессия первичного гуморального ответа [Козлов В.А. и др., 2002], что делает актуальным выявление особенностей формирования иммунной памяти при указанной патологии.

Понимание механизмов формирования иммунной памяти необходимо для успешной вакцинопрофилактики [Plotkin S.A., 2010], особенно учитывая случаи неудачной вакцинации отдельных индивидуумов, небольшую эффективность вакцин для создания клеточного анамнестического ответа, а также возникновение в последнее время новых, не встречаемых ранее инфекционных заболеваний. Кроме того, заболевания, в патогенезе которых лежат нарушения нормального функционирования иммунной системы (болезни с аутоиммунным компонентом, аллергии), по-видимому, развиваются по законам анамнестического иммунного ответа.

Целью данной работы является изучение клеточных и гуморальных реакций при антиген-индуцированных воздействиях и выявление регуляторных механизмов им-

мунных реакций, участвующих в процессе формирования иммунной памяти в норме и патологии.

В работе планируется решение следующих задач:

1. Изучить сопряженную динамику первичного и вторичного клеточного и гуморального иммунного ответа у мышей на разные дозы антигена.
2. Изучить влияние повторного введения антигена в ранние сроки формирования первичного иммунного ответа на выраженность первичного и вторичного ответа.
3. Исследовать связь пролиферативной активности антителопродукторов с интенсивностью вторичного иммунного ответа.
4. Изучить формирование иммунной памяти при хронической РТПХ как модели преимущественно Th1- или Th2-зависимых иммунопатологических состояний.
5. Оценить уровень TNF- α и уровень IgE в процессе формирования иммунной памяти в норме и при иммунопатологических состояниях, индуцированных хронической РТПХ.
6. Изучить возможную роль TNF-связывающего белка, рекомбинантного Π -1 β и препаратов, изменяющих синтез NO, в регуляции гуморального ответа и формирования иммунной памяти.

Научная новизна работы: Получены новые данные о закономерностях формирования иммунной памяти в норме и при иммунопатологических состояниях.

Показано снижение вторичного иммунного ответа, вызванное предшествующей гиперстимуляцией первичного IgM- и IgG-ответа на фоне повторного введения антигена в позднюю лог-фазу первичного IgM-гуморального ответа. Этот эффект дозозависим и наблюдается только при первичной иммунизации субоптимальной дозой этого же антигена.

Выявлено, что введение ингибитора синтеза ДНК ослабляет подъем количества IgM-антителопродукторов, вызванный дополнительным введением антигена в лог-фазу IgM-ответа, но не влияет на выраженность первичного и вторичного IgG-ответа.

Получены данные об участии TNF α в регуляции физиологического баланса процессов дифференцировки В-лимфоцитов в антителопродукторы и клетки памяти, проявляющемся в основном в момент активного образования IgM-антителопродукторов.

Обнаружена сопряженность между уровнем Π -1 β и выраженностью гуморального ответа: повышенное содержание этой формы цитокина в момент иммунизация (Осутки), достоверно снижает первичный и стимулирует вторичный IgG-ответ, что свидетельствует об участии Π -1 в регуляции В-клеточной дифференцировки в индуктивную фазу гуморального ответа на этот антиген.

Установлено, несмотря на глубокую депрессию первичного ответа при аутоиммунных процессах, индуцированных хронической РТПХ, вторичный ответ у таких мышей более сохранен: причем *lupus*-реципиенты способны к формированию иммунной памяти, тогда как *nonlupus*-реципиенты отвечают на повторное введение антигена сдвигом в сторону клеточно-опосредованных реакций.

Теоретическая и практическая значимость исследования: Полученные данные расширяют имеющиеся представления о регуляции иммунного ответа и подтверждают возможность направленно изменять интенсивность иммунного ответа и формирование иммунной памяти. Экспериментально выявленный стимулирующий эффект дополнительного введения антигена обосновывает создание новых схем вакцинаций: выбор оптимальных доз и способов введения антигенов. Учет результатов исследования позволяет также внести существенные положительные коррективы в технологический процесс получения специфических антител. Результаты работы да-

ют основания для разработки новых подходов к регуляции иммунных реакций при некоторых формах аутоиммунных заболеваний и аллергических состояний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Антиген является фактором, модулирующим иммунный ответ: при его дополнительном введении отмечается усиление первичного и подавление вторичного ответа.
2. Формирование иммунной памяти к чужеродному антигену протекает независимо от аутоиммунных процессов, индуцированных хронической РТПХ.
3. Уровень первичной реакции на антиген не является предопределяющим для формирования иммунной памяти благодаря существованию дискордантных взаимоотношений между развитием первичного и вторичного иммунного ответа.

Личный вклад автора в проведении исследования. Все представленные результаты экспериментальных исследований получены лично автором, либо при его непосредственном участии.

Апробация работы: Результаты диссертационной работы были представлены на Международной конференции «Фундаментальная наука медицине» (г. Новосибирск, 2007г.) и на конференции «Дни иммунологии в Сибири-2007» (г. Омск), а также доложены на Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и патологии» (г.Новосибирск, 2010г.), на международной конференции «Дни иммунологии в Сибири-2011» (г.Абакан) и на 8-й отчетной конференции НИИ КИ СО РАМН (г. Новосибирск, 2011).

Апробация диссертации состоялась 27 октября 2011г. на семинаре НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Публикации: По теме диссертационной работы опубликовано 20 работ, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура работы: Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования в 5 главах, их обсуждения, заключения и выводов. Материалы диссертации изложены на 121 страницах машинописного текста, результаты собственных исследований содержат 27 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 197 источников, из них 18 на русском языке.

Работа выполнена на базе лаборатории экспериментальной иммунотерапии отдела экспериментальной иммунологии НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные: В работе использовали мышей - гибридов первого поколения (C57Bl/6хDBA/2)F1 (B6D2F1), самок, гибридов первого поколения (CBAхC57BL/6)F1 (CB6F1), самцов и мышей линии DBA/2, самок, полученных из лаборатории экспериментальных животных (моделей) НИИКИ СО РАМН (Новосибирск). В опытах использовались мыши в возрасте 2-8 месяца. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Органы, клетки и ткани выделяли по стандартным методикам [Гольдберг Е.Д. и др., 1992].

Индукция хронической РТПХ проведена у мышей путём переноса самкам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Клетки селезёнки, выделенных ex tempore в стерильной среде RPMI-1640, внутривенно вводили реципиентам в дозе 65×10^6 клеток двукратно с интервалом в 5 дней [Kimura M. et al., 1987]. В качестве контроля использовали интактных животных того же генотипа, пола, возраста, что и в опыте.

Определение белка в моче. Содержание белка в моче определяли колориметрически с красителем Кумасси (Kum Sai brilliant blue)[Bradford M., 1976]. Калибровочную кривую строили по BSA (100-1000 мкг/мл), результаты (среднее двух измерений) выражали в мг/мл. О развитии гломерулонефрита судили по появлению стойкой протеинурии (не менее 3 мг/мл в двух последовательных измерениях).

Гуморальный иммунный ответ на Т-зависимый антиген – эритроциты барана (ЭБ) - оценивали на пике ответа, свойственного генотипу, по количеству локальных зон гемолиза в жидкой среде RPMI-1640 [Cunningham A.J., 1965].

Клеточный иммунный ответ оценивали по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ): измеряли величину отёка лапы после введения разрешающей дозы ЭБ сенсибилизированным животным по стандартной методике [Yoshikai Y., 1979; Muracami M. et al., 1995].

Концентрацию TNF α и IgE в периферической крови и сыворотке крови определяли твёрдофазным вариантом метода иммуоферментного анализа с помощью тест-системы «Bioscience» (для TNF α), в первом случае, и BD OptEIA™ (для IgE), во втором. Результаты выражали в абсолютных значениях в пкг/мл и в мкг/мл, соответственно.

Статистическая обработка полученных данных. Поскольку распределение показателей внутри экспериментальных групп не являлось нормальным, статистическую обработку проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [Гублер Е.В., 1978]. Все результаты представлены в виде средних значений измеряемых параметров (M). Отличия между сравниваемыми величинами показателей различных экспериментальных групп считали достоверными при $p < 0,05$. На рисунках и в таблицах, кроме специально оговоренных случаев, отмечены достоверные различия: * - между контрольной и опытной группой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Влияние дополнительного введения антигена на гуморальное звено иммунного ответа

Предварительные эксперименты, обнаружившие регуляторный эффект введения антигена в позднюю лог-фазу первичного иммунного ответа, были проведены на иммунизированных мышах, которым под апоневроз задней лапки вводили 5×10^8 ЭБ для оценки реакции ГЗТ. При этом было установлено, что такое введение антигена, сопровождающееся локальной воспалительной реакцией в месте введения, оказывает также выраженное супрессивное влияние на последующий вторичный гуморальный иммунный ответ. Мыши разных генотипов обнаруживают одинаковую закономерность подавления анамнестической реакции, отличие проявляется лишь в выраженности супрессии (Рис. 1).

Причиной данного эффекта может быть как изменение цитокинового баланса в организме под влиянием индукции клеточного ответа в период образования клеток памяти, так и влияние самого антигена, воздействующего на процесс образования антителлопродуцирующих клеток. Для проверки последнего предположения было изучено действие дополнительного введения антигена в продуктивную фазу гуморального иммунного ответа на образование IgM- и IgG-антителопродукторов в селезёнке. Учитывая, что в предыдущих опытах индукцию ГЗТ осуществляли на 4 сутки, при изучении эффекта антигена на образование АОК в продуктивную фазу ответа повторное введение ЭБ проводили также на 4-е сутки после первичной иммунизации. Так как количество IgM-АОК в селезёнке определяли через сутки после повторного введения ЭБ, мышам, у которых оценивали образование IgG-АОК, разделили на

две группы: одним ЭБ вводили также на 4-е сутки после первой иммунизации, вторым – на 8-е сутки, то есть за сутки до оценки количества IgG-АОК в селезенке на пике IgG-ответа, который приходился на 9 сутки после иммунизации.

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).
 *-достоверные изменения относительно контроля (p<0,05)

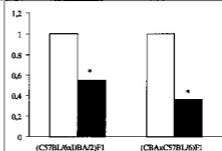
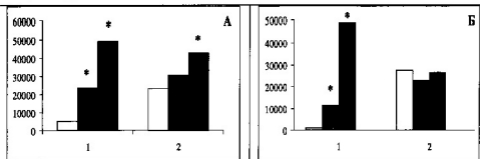


Рис. 1. Уровень вторичного ответа при введении разрешающей дозы под апоневроз через 4 суток после первой иммунизации у мышей разных генотипов.

На Рис. 2 видно, что введение антигена в конце лог-фазы IgM-ответа приводит к гиперстимуляции гуморального ответа. 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 сутки (Рис. 2А). В случае IgG-антителопродуцентов стимуляция ещё более выражена и характеризуется 10-кратным увеличением их количества у стимулированных животных (рис. 2 Б). Эффект наиболее выражен при первичной иммунизации субоптимальной дозой антигена.



По оси ординат – количество IgM-АОК (А) и IgG-АОК (Б) на селезенку; по оси абсцисс - доза первичной иммунизации; 1-субоптимальная 1×10^7 ЭБ/мышь; 2 - оптимальная 2×10^8 ЭБ/мышь.
 Белые столбцы – контрольная группа без дополнительного введения антигена (n=9-11), серые столбцы – группа с повторным введением антигена в дозе 1×10^7 ЭБ/мышь (А n=10; Б n=5), черные столбцы - группа с повторным введением антигена в дозе 2×10^8 ЭБ/мышь (А n=10; Б n=5); * - достоверные изменения относительно контроля (p<0,05)

Рис.2. Количество IgM-АОК и IgG-АОК в селезенке мышей BDF1 при повторном введении антигена через 4 суток после иммунизации; (М).

В то же время дополнительное введение антигена за сутки до пика IgG-ответа (через 8 суток после иммунизации) не приводит к подобному эффекту, более того, число IgG-АОК даже достоверно снижается с 1 187 в контроле до 625 (в группе мышей с дополнительным введением субоптимальной дозы антигена 1×10^7 ЭБ). Объяс-

нение этого различия между эффектами дополнительного введения антигена на пике IgM или IgG-ответа (т.е. на 4 или 8 сутки) может быть связано со стимулирующим действием комплексов IgM-антител с антигеном [Hjelm F., 2006].

На Рис. 3 продемонстрировано, что усиление IgM- и IgG- образования в селезенке при повторном низкодозовом введении антигена полностью аналогично увеличению числа IgM- и IgG-АОК при дополнительном введении разрешающей дозы антигена под апоневроз стопы.

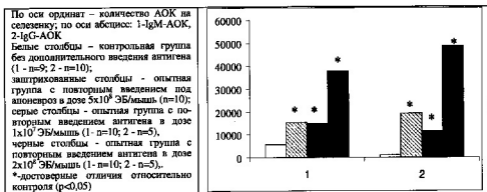


Рис. 3. Сравнение уровня первичного гуморального ответа у гибридов BDF1 при разных способах и дозах дополнительного введения антигена на 4 сутки в лог-фазу IgM-ответа. Первичная иммунизация в дозе 1×10^7 ЭБ/мышь; (М).

Эффект подавления вторичного ответа при введении разрешающей дозы антигена (и, как следствие, при развитии реакции ГЗТ) аналогичен таковому при внутривенном введении субоптимальной дозы антигена (Рис. 4), 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-антителопродукторов.

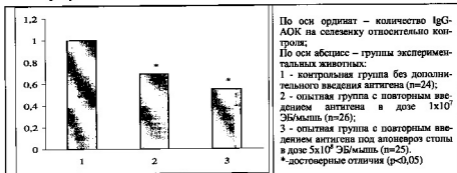


Рис. 4. Уровень вторичного ответа при дополнительном поступлении антигена в конце лог-фазу первичного IgM-ответа у мышей BDF1; (М).

Таким образом, подъём количества клеток-антителопродуцентов при повторном введении антигена в конце лог-фазы, показанный в наших экспериментах, 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 сутки. Такие эффекты предполагают участие мощных регуляторных факторов. 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 [Hjelm F., 2006]. В качестве одного из возможных механизмов реализации их действия может быть рассмотрена стимуляция пролиферативных процессов В-лимфоцитов, дифференцирующихся в антителопродуценты.

2. Проллиферативная активность антителопродуцентов и ее вклад в гуморальный иммунный ответ

Для изучения роли пролиферативных процессов в стимулирующем эффекте дополнительного поступления антигена была проведена серия экспериментов с введением гидроксимочевины (ГМ) - ингибитора синтеза ДНК [Morse B.S., 1969].

Схема эксперимента: Всех животных, предварительно иммунизированных субоптимальной дозой антигена, на четвертые сутки делили на три группы: 1 группа: контроль - без дополнительного поступления антигена; 2 группа - с дополнительным субоптимальным внутривенным введением (1×10^7 ЭБ/мышь) и 3 группа - с введением антигена под апоневроз (5×10^8 ЭБ/мышь).

При введении гидроксимочевины мышам в лог-фазу первичного IgM-ответа наблюдается выраженное подавление продукции IgM- и IgG-антител при стандартной иммунизации животных, но воздействие на стимуляцию IgM- и IgG-ответа оказывается неоднозначным (Рис. 5).

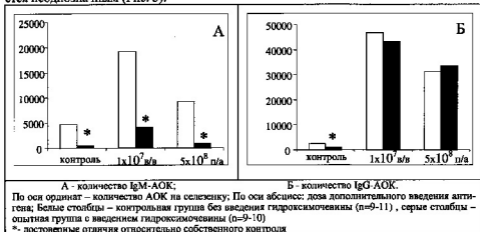


Рис. 5. Количество IgM- и IgG-АОК в селезенке мышей BDF1 при повторном введении антигена через 4 суток после иммунизации на фоне введения гидроксимочевины. Первичная иммунизация - субоптимальной дозой антигена; (М).

Так, введение гидроксимочевины через 4 суток после иммунизации одновременно с повторным введением антигена вызывает ослабление стимулирующего эффекта в случае IgM-ответа, хотя количество IgM-АОК в селезенке остается на достаточно высоком уровне, сравнимом с таковым в контрольной группе мышей, которых иммунизировали, но не подвергали дальнейшим воздействиям (Рис 5А).

Таким образом, большая часть IgM-АОК при стимуляции повторным введением антигена действительно представлена активно пролиферирующими клетками, при этом можно предположить как некоторое укорочение продолжительности клеточного цикла, так и сдерживание выхода клеток из делящегося пула. Однако определенная часть IgM-антителопродуцентов при этом оказывается принадлежащей к неделящейся популяции, что свидетельствует о существовании и других механизмов реализации стимулирующего влияния антигена, кроме усиления пролиферации антителопродуцентов. Возможно, при стимуляции в ответ вовлекаются клетки, которые без стимуляции менее интенсивно продуцируют антитела, что не позволяет определить их стандартными методами. Также речь может идти о клетках, которые при однократной иммунизации в этот период подвергаются апоптозу; повторное введение антигена может обеспечивать их сигналами для выживания [Crowley J.E., 2008, Tarlinton D, 2008].

На вторичный иммунный ответ элиминация пролиферации антителопродуцентов в позднюю лог-фазу первичного ответа (на 4 сутки) не влияет во всех вариантах (Таблица 1).

Таблица 1

Количество IgG-АОК в селезенке мышей BDF1 при вторичном иммунном ответе на фоне введения гидроксимочевины; (М).

Дополнительное введение АГ Доза первичной иммунизации	Контроль (без АГ)		1×10^7 н/в		5×10^6 н/в	
	без ГМ	с ГМ	без ГМ	с ГМ	Без ГМ	с ГМ
1×10^7 н/в Эб/мышь	651 304 (n=15)	482 169 (n=15)	465 435 (n=16)	417 394 (n=15)	442 261 (n=15)	611 740 (n=15)

Отсутствие эффекта ГМ в данном случае можно объяснить тем, что при повторном введении антигена в активную пролиферацию вовлекаются клетки-предшественники IgG-антителопродуцентов, пролиферация которых начинается позднее и не подавляется ГМ. Чтобы исключить такую возможность, были проведены эксперименты с введением ГМ в более поздние сроки. Однако введение ингибитора на 6, 8, или 10 сутки первичного иммунного ответа также не приводит к снижению количества IgG-АОК при вторичном ответе.

Таким образом, элиминация пролиферирующих антителопродуцентов в конце лог-фазы развивающегося IgM-ответа оказывает неоднозначный эффект на IgM и IgG-антителобразование в селезенке: полное ограничение подъема IgM-антителобразующих клеток и только частичная отмена стимуляции как первичного, так и вторичного IgG-ответа. Введение ингибитора синтеза ДНК в более поздние сроки первичного ответа вовсе не приводит к видимым изменениям выраженности вторичного IgG-ответа. Это не позволяет нам выявить другую более значимую фазу первичного ответа, регуляция процессов в которой изменяет последующий вторичный ответ. Значит нельзя с уверенностью говорить и о том, что клетки-предшественники IgG-антителопродуцентов, которые пролиферируют позднее и по нашему мнению могут служить основой для анамнестической реакции, являются критичным фактором, вносящим вклад в формирование иммунной памяти.

3. Эндogenous модуляторы гуморального иммунного ответа

3.1 Уровень TNF α в сыворотке мышей BDF1 при антигенной гиперстимуляции первичного гуморального иммунного ответа. Стимуляция клеток-антителопродукторов под влиянием вновь поступившего антигена может вызывать дополнительную секрецию цитокинов, которые играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа. Одним из таких цитокинов является TNF α . Хотя наиболее выраженной является его роль в системном воспалении, показано участие TNF α во многих иммунных процессах, в том числе, в В-клеточной активации.

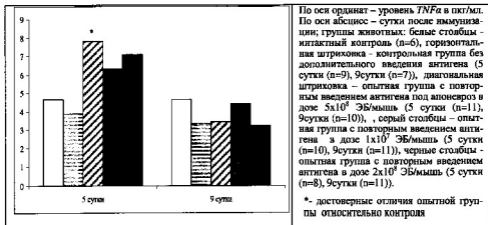


Рис. 6. Количество TNF α в сыворотке самок мышей BDF1 при антигенной гиперстимуляции гуморального иммунного ответа; (M).

Изучение уровня TNF α в наших исследованиях показало (Рис. 6), что как на пике IgM- и IgG-ответа концентрация TNF α у иммунных мышей контрольной группы достоверно не отличается от интактного контроля. В то же время антигенная стимуляция ответа сопровождается возрастанием уровня TNF α на пике IgM-ответа до 7,75 пг/мл против 3,9 пг/мл в иммунизированном контроле. В дальнейшем происходит снижение концентрации TNF α и на пике IgG-ответа она не отличается от контрольных значений (4,5 пг/мл).

Таким образом, подъем уровня TNF α приходится на период активного образования IgM-антителопродукторов. Можно предположить, что резкая стимуляция иммунного ответа дополнительным поступлением антигена обусловлена взаимосвязанными процессами активации В-клеток и продукции ими TNF α , которые начинают поддерживать друг друга по принципу положительной обратной связи, что оказывается немаловажным при формировании иммунной памяти.

Для проверки этого предположения и отмены возможных эффектов TNF α мышам вводили TNF-связывающий белок вируса натуральной оспы в дозе 12 нг/мл (однократно - через 4 суток после иммунизации или трехкратно - через 4, 6 и 8 суток).

Данные Таблицы 2 свидетельствуют, что введение TNF-связывающего белка снижает первичный гуморальный ответ и оказывает стимулирующий эффект на вторичный ответ.

Таблица 2

Величина первичного гуморального ответа у мышей BDF1на T-зависимый антиген на фоне введения TNF-связывающего белка (M).

Пик гуморального иммунного ответа в контрольных и опытных группах (без АГ и с АГ)		Введение TNF-связывающего белка					
		Без введения	n	Однократное (4 сутки)	n	Трехкратное (4,6 и 8 сутки)	n
IgM-АОК (5 сутки)	Без АГ	10 972	10	5 590*	10		
	АГ	15 132	6	8 123*	10		
IgG-АОК (9 сутки)	Без АГ	393	10	252	6	271	10
	АГ	13 026	10	15 296	10	16 652	7
IgG-АОК (4 сутки после вторичной иммунизации)	Без АГ	883 947	24	958 985	22	1 334 123*	10
	АГ	655 608	24	721 601	27	702 435	17

Видно, что однократное введение белка на 4 сутки в момент дополнительного введения антигена вызывает двукратное уменьшение количества IgM-АОК как в контрольных группах мышей, так и в опытных группах, на фоне дополнительной стимуляции антигеном. Однако связывание TNF α не влияет на образование IgG-антителопродукторов даже при многократном введении.

Изучение анамнестической реакции показало, что подавление IgM-ответа, вызванное связыванием TNF α , сопровождается стимуляцией вторичного ответа при стандартной иммунизации: трехкратное введение TNF-связывающего белка приводит к достоверному снижению количества вторичных IgG-АОК, что говорит о кумулятивном эффекте препарата. Подобный эффект не проявляется на фоне стимулированного ответа; возможной причиной этого может быть недостаточная доза TNF-связывающего белка в связи с повышенным уровнем TNF α при стимуляции.

Эти результаты свидетельствуют об участии TNF α в регуляции физиологического баланса между процессами дифференцировки В-лимфоцитов в антителопродукторы, либо в клетки памяти, что определяется в момент активного образования IgM-антителообразующих клеток.

3.2 И-1 в регуляции иммунного ответа. Поскольку И-1 играет немаловажную роль в стимуляции гуморального иммунного ответа [Bryan V.L., 2007], то интересно было оценить влияние рекомбинантного И-1 β на первичный и вторичный ответ *in vivo* в рамках нашей модели гиперстимуляции иммунного ответа.

Результаты проведенных экспериментов представлены на Рис. 7. Видно, что введение И-1 β на 4 сутки после иммунизации не оказывает существенного влияния на величину как первичного, так и вторичного иммунного ответа. Вероятно, данный интерлейкин не является ключевым регулятором пролиферации антителопродукторов и клеток памяти в этот период, предшествующий пику IgM-ответа, и следовательно, нет оснований предполагать его решающее участие в механизме обнаруженной модуляции иммунных реакций под действием дополнительного введения антигена.

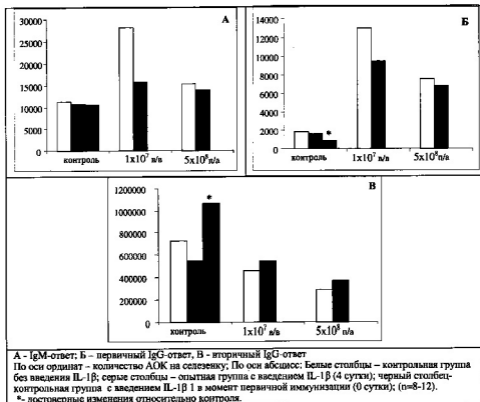


Рис. 7. Гуморальный иммунный ответ у мышей BDF1 на фоне введения PL-1β; (M).

В то же время введение PL-1β одновременно с первичной иммунизацией животных (в опытах без дополнительной антигенной стимуляции) значительно снижает уровень первичного IgG-ответа на антиген (Рис. 7Б) и стимулирует позднее проявляющуюся анамнестическую реакцию на тот же антиген (Рис. 7В), но не изменяет уровень первичного IgM-ответа (Рис. 7А).

Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в системе *in vitro* [Koyama N. et al., 1988] и говорящими о том, что PL-1β стимулирует дифференцировку В-лимфоцитов лишь в первые двое суток после их контакта с антигеном. Учитывая эти и другие имеющиеся в литературе данные можно сделать вывод, что обнаруженное нами дискордантное действие PL-1β на первичный IgG-ответ и на образование клеток памяти является выражением его важной роли в регуляции В-клеточной дифференцировки на ранних этапах развития гуморальных иммунных реакций.

3.3 Уровень IgE в сыворотке мышей BDF1 в динамике развития первичного и вторичного гуморального иммунного ответа. П-4 является важнейшим эндогенным регулятором дифференцировки и функциональной активности В-клеток. Для оценки его уровня в организме использовали определение концентрации IgE в сыворотке

крови, поскольку существуют многочисленные данные об однозначной прямой корреляции между концентрацией IgE и продукцией И-4 в организме [Umland S.P. et al, 1992; Schorlemmer H.U et al, 1997].

Многочисленные измерения уровня IgE в динамике развития гуморальных иммунных реакций на разные дозы антигена (со второго дня после первичной иммунизации до пика вторичного IgG-ответа) не выявили существенных изменений этого параметра по сравнению с интактными (неиммунизированными) животными. Это позволяет предположить, что хотя И-4 и необходим для осуществления гуморального иммунного ответа, его физиологический уровень достаточно высок и не лимитирует активацию и пролиферацию антигенспецифических В-лимфоцитов.

3.4. Оксид азота (NO) в регуляции гуморального иммунного ответа. Показано, что продукция NO в органах иммунной системы увеличивается при иммунизации и влияет на формирование Т-клеток памяти, скорее всего за счет нарушения процессов апоптоза антиген-активированных клеток [Меньшикова Е.Б. и др., 2000; Vig M et al, 2004]. Поэтому интересно было оценить влияние уровня NO на развитие гуморальных иммунных реакций. С этой целью иммунизированным мышам на протяжении 8 суток (ежедневно, начиная с 4 суток) вводили либо аминоксидантин - ингибитор продукции NO [Iadecola C. et al, 1997], либо L-норвалин, стимулирующий его образование в клетках [Erden C.D., 2003].

Предполагалось, что введение этих препаратов может изменить количество клеток, продуцирующих IgM- и IgG-антитела. Однако результаты проведенных экспериментов не дают убедительных доказательств того, что уровень продукции NO влияет на развитие исследованных иммунных реакций: достоверных изменений выраженности интенсивности ни первичного, ни вторичного гуморального ответа обнаружено не было.

4. Формирование иммунной памяти при развитии патологии

В качестве модели использована хроническая РТПХ, индуцированная в системе DBA/2 \rightarrow (DBA/2 \times C57Bl/6)F1, развитие которой идет по двум оппозитным вариантам, приводя к возникновению либо иммунокомплексного гломерулонефрита (*lupus*-реципиенты), либо иммунопатологического состояния без выраженного поражения почек (*nonlupus*-реципиенты). Показано, что развитие обоих вариантов хРТПХ сопровождается выраженной супрессией первичного иммунного ответа на Т-зависимый антиген, особенно резко снижено количество IgG-АОК в селезенке, которое составляет 0,4% и 10,2% относительно контроля, соответственно, у *nonlupus*- и *lupus*-реципиентов [Кудаева О.Т. и др., 2010]. Учитывая это, у животных с различными клиническими вариантами течения хРТПХ было изучено формирование иммунной памяти и проверено, сохранена ли у них способность, несмотря на супрессию первичного иммунного ответа, отвечать его повышением на дополнительное введение антигена.

Результаты проведенных экспериментов представлены на Рис. 8. Видно, что анамнестическая реакция у мышей с обоими вариантами иммунопатологии достоверно подавлена по сравнению с интактным контролем. В то же время выраженность супрессии при вторичном иммунном ответе оказывается значительно меньшей, нежели при первичном IgM и IgG-ответе: при первичной иммунизации субоптимальной дозой антигена у *nonlupus*-реципиентов количество вторичных IgG-АОК составляет 41%, а у *lupus*-66% относительно контроля, при первичной иммунизации оптимальной дозой антигена эти значения достигают 30,5 и 50% соответственно.

Супрессия гуморального ответа более выражена в группе *nonlupus*-реципиентов, что проявляется как в отношении первичного IgG-ответа, так и при оценке количеств

ва IgG-антителопродуцентов в селезёнке и костном мозге при вторичном ответе (Рис.8).

Таким образом, глубокая депрессия первичного ответа не сопровождается подавлением в такой же степени анамнестической реакции; вторичный иммунный ответ оказывается относительно более сохранным, особенно при иммунизации оптимальной дозой антигена у *lupus*-рецидивентов. Возможно, это свидетельствует о более жёстко закреплённых процессах формирования иммунной памяти, устойчивых к действию факторов, регулирующих высоту первичного ответа. Выяснение причин дискорданса между уровнем первичного и вторичного ответа при хронической РТПХ требует дальнейшего исследования.

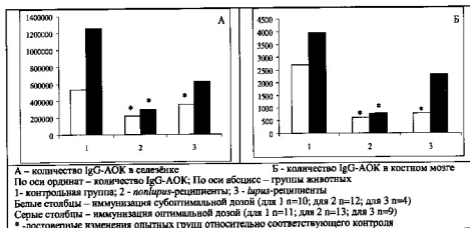


Рис. 8. Уровень вторичного гуморального иммунного ответа у рецидивентов с хронической РТПХ; (М).

Данные, представленные на Рис. 9, демонстрируют, что дополнительное введение антигена в позднюю лог-фазу развивающегося первичного ответа, так же как и у мышей в норме, приводит к гиперстимуляции IgG-ответа.

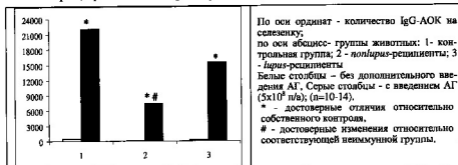


Рис. 9. Уровень первичного IgG-гуморального ответа у мышей с хронической РТПХ при дополнительном введении антигена; (М).

Однако количество IgG-АОК в *nonlupus*- и *lupus*-группах, остается сниженным по сравнению с аналогичными мышами в контрольной группе, причем у *nonlupus*-

мышей это снижение достигает степени достоверности (Рис. 9), что, вероятно, можно объяснить имеющимся у них преобладанием Th1-зависимых иммунных реакций.

Известно, что индукция РТПХ сопровождается мощным всплеском продукции цитокинов разными популяциями иммунных клеток - «цитокиновым штормом» [Ferraga J.L., 2000; Krenger W. et Ferrara J.L., 1996]. В частности, в обоих случаях на ранних стадиях происходит возрастание продукции ИЛ-4 [Murphy W.J. et al, 1998, Rus V. et al, 1995]. Ранее по оценке уровня IgE нами показано, что происходит выраженная стимуляция продукции ИЛ-4 при хронической РТПХ, которая только при достижении относительно более высоких значений сопровождается формированием аутоиммунной патологии [Гойман Е.В. и др., 2009].

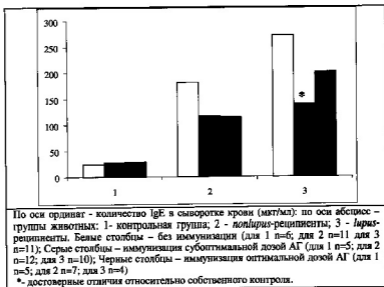


Рис. 10. Уровень IgE у реципиентов с хронической РТПХ при формировании иммунной памяти; (М).

Оценка уровня IgE при формировании иммунной памяти у животных с патологией, проведенная в данной работе, еще раз подтвердило, что индукция РТПХ приводит к стимуляции IgE (Рис. 10). Группы контрольных животных содержат более низкий уровень этого иммуноглобулина, чем *nonlupus*- и *lupus*-реципиенты. Причем низкий уровень IgE в контрольных группах не изменяется под действием антигена. В то же время у мышей с патологией после формирования иммунной памяти вторичный IgG-ответ сопровождается определенным сдвигом в сторону снижения уровня IgE в сыворотке, причем у *lupus*-мышей это снижение статистически достоверно. Эти данные можно расценить как косвенное свидетельство того, что исследованные нами иммунопатологические состояния приводят к принципиальному изменению механизмов цитокиновой регуляции гуморальных иммунных реакций.

Резюмируя полученные в работе данные, можно сказать, что изменения уровней первичного и вторичного ответов, выявленные при использовании разных доз антигена на животных разных генотипов, свидетельствуют, что для образования пула клеток памяти и/или долгоживущих плазматических клеток достаточно минималь-

ного 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 работе обратная зависимость между уровнями первичного и вторичного ответа на антиген демонстрирует наличие закономерной связи интенсивности анамнестической реакции с величиной первичного IgM- и IgG-ответа в ситуации резко 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.

ВЫВОДЫ:

1. Повторное введение антигена в позднюю лог-фазу первичного ответа приводит к резкому увеличению количества как IgM-, так и IgG-антителопродуцентов на пике первичного ответа и в тоже время снижает уровень вторичного IgG-ответа, что свидетельствует о модулирующем действии антигена. Эффект на первичный ответ дозозависим и наблюдается только при субоптимальной иммунизации мышей.

2. При введении антигена в позднюю лог-фазу первичного ответа как подкожно (под апоневроз), так и при внутривенном введении наблюдается подавление анамнестического ответа. Это указывает на то, что фактором, супрессирующим формирование иммунной памяти, являются системные реакции, вызванные дополнительным введением антигена, а не локально развивающееся воспаление в месте его поступления в организм.

3. Введение гидроксимочевины - ингибитора синтеза ДНК - одновременно с дополнительным введением антигена во время лог-фазы первичного IgM-ответа снижает подъём IgM-АОК, но не отменяет стимуляцию образования количества первичных и вторичных IgG-АОК, что указывает на важную роль в стимуляции IgM-ответа, вызванной повторным введением антигена, пролиферативных процессов.

4. При стимуляции ответа наблюдается подъём уровня TNF α , пик которого приходится на период активного образования IgM-антителопродуцентов. Связывание TNF α , введением TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы в момент дополнительного поступления антигена, подавляет стимуляцию первичного и подавление вторичного ответа, что позволяет говорить о важной роли TNF α в дифференцировке В-лимфоцитов в антителопродуценты и клетки памяти.

5. Введение И-1 β в момент иммунизации, но не в позднюю лог-фазу развивающегося IgM-ответа, достоверно снижает первичный и стимулирует вторичный IgG-гуморальный ответ, что свидетельствует об участии И-1 β в регуляции гуморальных иммунных реакций в индуктивную фазу первичного ответа на антиген.

6. Глубокая депрессия первичного ответа в экспериментальных моделях, индуцированных хронической РТПХ, не сопровождается подавлением в такой же степени анамнестической реакции. Эффект проявляется более выражено у *lupus*-реципиентов при первичной иммунизации оптимальной дозой антигена. Это свидетельствует о более жёстко закреплённых процессах формирования иммунной памяти, устойчивых к действию факторов, регулирующих высоту первичного ответа, у мышей при развитии аутоиммунных патологических состояний.

7. Дискордантные изменения первичного гуморального ответа на Т-зависимый антиген и последующей анамнестической реакции, наблюдаемые при физиологических и иммунопатологических состояниях, в частности, при дополнительном поступлении этого же антигена в организм или действии других регулирующих факторов,

таких как TNF α и И-1 β , свидетельствуют о том, что уровень первичной реакции на антиген не является предопределяющим для формирования иммунной памяти.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П. Регуляторные взаимодействия между клеточным и гуморальным иммунным ответом при формировании иммунной памяти // Материалы Всероссийского научного симпозиума «Цитокины. Стволовая клетка. Иммунитет» - Новосибирск, 19-21 июля 2005 // Цитокины и воспаление. - 2005. - Т.4. - №2. - С.83.
2. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П. Регуляторные механизмы и взаимосвязь между клеточным и гуморальным иммунным ответом при формировании иммунной памяти // Материалы 2-й Российской школы по иммуноterapiи. Цитокины и воспаление. - 2005. - Т.4. - №3. - С.133.
3. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П. Регуляторные взаимодействия между клеточным и гуморальным звеньями иммунного ответа при формировании иммунной памяти на Т-зависимый антиген // Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике. Сб. материалов 7-й отчетной конференции ГУ НИИКИ СО РАМН, Новосибирск. - 2006. - С.33-36.
4. Гаврилова Е.Д., Кудасва 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). - С.32-35.
5. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П. Стимуляция синтеза антител в продуктивную фазу ответа низкими дозами антигена. Тезисы 3 Международной конференции «Фундаментальная наука - медицине» - Новосибирск. - 2007. - С. 112.
6. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П. // Антиген как фактор регуляции синтеза антител в продуктивную фазу иммунного ответа // Омский научный вестник. - 2007. - Т.61. - №3. - С.17-18.
7. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. Роль пролиферативной активности антителопродукторов в формировании иммунной памяти // Матер. конфер. «Дни иммунологии в Сибири-2008». Сиб. мед. журн. - 2008. - Т.23. - №3 (выпуск 1). - С.89.
8. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. Роль пролиферирующих антителопродукторов в формировании иммунной памяти // Тез. Объединенного иммунологического форума Санкт-Петербург - 2008. Рос. иммунол. журн. - 2008. - Т.2(11). - №2-3. - С.119.
9. Гойман Е.В., Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П. Уровень IgE в динамике развития разных вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2009. - №2/1(24). - С.27-28.
10. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Перминова О.М., Колесникова О.П. Изучение общего уровня IgE при первичном и вторичном иммунном ответе // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2009. - №2/1(24). - С.244-245.
11. Кудасва О.Т., Гаврилова Е.Д., Гойман Е. В., Ненашева Е.В., Колесникова О.П., Козлов В.А. Особенности иммунодепрессии при хронической реакции «трансплантат против хозяина» // Иммунология. - 2010. - №4. - С.199-203.
12. Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Гойман Е.В., Колесникова О.П. Особенности иммунного ответа при хронической реакции трансплантат против хозяина // Всероссийск. научн.-практ. конф. с межд. участием «Дни иммунологии в Сибири», Красноярск. - 2010. - С.13-15.

13. Гаврилова Е.Д., Кудашева О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. Стимуляция иммунного ответа: резистентность к ингибиторам пролиферации // БЭБиМ. - 2010. - Т.149. - №3. - С.328-331; 304-307 (англ).
14. Кудашева О.Т., Гаврилова Е.Д., Колесникова О.П., Козлов В.А. Формирование иммунной памяти при стимуляции первичного гуморального ответа // Росс.иммунолог.журн. - 2010. - Т.4(13). - №3. - С.237-247.
15. Гаврилова Е.Д., Ткачев В.О., Кудашева О.Т., Колесникова О.П. Участие TNF α в феномене антигенной гиперстимуляции гуморального иммунного ответа // Всероссийск. конф. «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии», Новосибирск, 2010. - Цитокины и воспаление. - 2010. - Т.10. - №3. - С.51-52.
16. Гаврилова Е.Д., Кудашева О.Т., Ткачев В.О., Гилева И.П., Колесникова О.П. Регуляция процессов антителообразования при антигенной гиперстимуляции гуморального иммунного ответа // Матер. конфер. «Дни иммунологии в Сибири-2011». - Абакан.- С.10-12.
17. Кудашева О.Т., Гаврилова Е.Д., Ткачев В.О., Гилева И.П., Колесникова О.П. Дискордантное развитие первичного и вторичного иммунного ответа при экспериментальных воздействиях // Матер XIV всероссийского научного Форума «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2011» - Медицинская иммунология. - 2011. - Т.13.- №4-5. - С.320-321.
18. Гаврилова Е.Д. Антиген как фактор регуляции первичного гуморального иммунного ответа // Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике. Сб. материалов 8-й отчетной конференции НИИКИ СО РАМН. - Новосибирск. - 2011. - С.22-24.
19. Кудашева О.Т., Гаврилова Е.Д. Дискордантное развитие первичного и вторичного иммунного ответа // Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике. Сб. материалов 8-й отчетной конференции НИИКИ СО РАМН. - Новосибирск. - 2011. - С.36-38.
20. Гаврилова Е.Д., Кудашева О.Т., Ткачев В.О., Гилева И.П., Колесникова О.П. Участие TNF α в регуляции процессов антителообразования // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2011. - № 2/2, (35) - С. 19-20.

Подписано в печать 01.12.2011 г. Формат 60x84/16
Бумага офсетная. Печать Riso. Гарнитура Times New Roman
Уч.-изд. л. 1.14. Усл. п. л. 1.6. Тираж 100 экз. Заказ № 141
630102, г. Новосибирск, ул. Нижегородская, 6, СибАГС