

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

## ВКЛАД ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛОПРОДУЦЕНТОВ В ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬ К ИНГИБИТОРАМ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

*Показан эффект гиперстимуляции первичного иммунного ответа дополнительным введением антигена в конце лог-фазы первичного IgM-ответа; при этом многократное увеличение числа IgM- и IgG-АОК в селезенке в результате первичного ответа сопровождалось подавлением анамнестической реакции. Введение гидроксимочевина — ингибитора синтеза ДНК — одновременно с дополнительным введением антигена во время лог-фазы первичного IgM-ответа снижает подъем IgM-АОК, но не отменяет стимуляцию образования количества первичных и не изменяет численность вторичных IgG-АОК, что указывает на важную роль в стимуляции IgM-ответа, вызванной повторным введением антигена, пролиферативных процессов. Стимуляция пролиферации В-лимфоцитов, дифференцирующихся в антителопродуценты, существенно сокращает пул клеток памяти и, как следствие, супрессирует вторичный иммунный ответ.*

**Ключевые слова:** IgM- и IgG-антителообразующие клетки, гидроксимочевина, иммунная память

## THE DEPOSIT OF ANTIBODY'S PROLIFERATIVE ACTIVITY IN THE IMMUNE RESPONSE AND ITS RESISTANCE TO INHIBITORS OF PROLIFERATION

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

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

*The effect of hyperstimulation of the primary immune response was showed by additional introducing of antigen in the late log-phase of the primary IgM-response. The multiple increase of IgM-and IgG-antibody productive cells (APC) in the spleen during the primary response was accompanied by suppression of anamnestic response. The injection of hydroxyurea (an inhibitor of DNA synthesis) together with the additional introduction of the antigen at the late log-phase of the primary IgM-response reduces the rise of IgM-APC, but does not abolish the stimulation of the primary and secondary IgG-APC formation. This fact indicates that proliferative processes play an important role in the stimulation of IgM-response induced by reinjection of the antigen. The stimulation of proliferation of B-lymphocytes which differentiate into antibody productive cells significantly reduces the pool of memory cells and, consequently, suppresses secondary immune response.*

**Key words:** IgM- and IgG-antibody producing cells; hydroxyurea, the immune memory

Накопилось большое количество литературных данных о клеточных и молекулярно-генетических механизмах синтеза антител. Однако до сих пор существует много невыясненных вопросов регуляции гуморального иммунного ответа на уровне целостного организма [4, 5, 6]. Наряду с особенностями текущего состояния организма антиген является тем критерием, который определяет путь развития гуморального ответа. Именно от способа поступления, дозы, продолжительности и места нахождения антигена в организме зависит динамика и выраженность процесса [15].

**Целью** данной работы было оценить эффект дополнительного поступления антигена в разные фазы первичного ответа на выраженность гуморального ответа, а так же оценить вклад пролиферативной активности антителопродуцентов, как одного из возможных механизмов, значимого в регуляции иммунного ответа и формировании памяти.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали гибридов (С57В1/6хДВА) F<sub>1</sub>, самок, в возрасте 2 — 3 месяцев, полученных из экспериментально-биологический 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) эритроцитами барана (ЭБ) субоптимальной ( $1 \times 10^7$  ЭБ/мышь) и оптимальной ( $2 \times 10^8$  ЭБ/мышь) дозами. Величину гуморального иммунного ответа определяли путем подсчета количества IgM- и IgG-антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в селезенке мышей на пике иммунного ответа. Максимальное количество IgM-АОК в селезенке мышей данного генотипа наблюдается через 5 суток, IgG-АОК — через 9 суток после иммунизации [2]. Для оценки эффекта дополнительного введения антигена повторное введение антигена проводили также в субоптимальной и оптимальной дозах в/в за сутки до пика ответа: через 4 суток для оценки IgM-ответа и вторичного IgG-ответа, через 4 или 8 суток для оценки первичного IgG-ответа.

Для элиминации пролиферирующих клеток всех животных, предварительно иммунизированных в/в субоптимальной дозой, на четвертые сутки делили на три группы: 1-я группа: контроль — без дополнительного поступления антигена; 2-я группа — с дополнительным субоптимальным внутривенным введением ( $1 \times 10^7$  ЭБ/мышь) и 3-я

группа — с введением антигена под апоневроз ( $5 \times 10^8$  ЭБ/мышь). Одновременно с дополнительным введением антигена, через 4 суток после первичной иммунизации, вводили гидроксимочевину (ГМ) двукратно с интервалом в 7 часов из расчета 1 г на 1 кг массы тела [12]. Для оценки вторичного ответа ингибицию синтеза ДНК наряду с 4 сутками осуществляли так же на 6-е, 8-е и 10-е сутки после первичной иммунизации аналогичным образом, т.е. двукратно с интервалом в 7 часов.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики; различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что дополнительное поступление антигена в позднюю лог-фазу IgM-ответа оказывает стимулирующее влияние на развивающийся первичный ответ в селезенке. Эффект повторного введения антигена через 4 суток после иммунизации является дозозависимым: он более выражен при использовании для первичной иммунизации субоптимальной дозы антигена и при повторном введении большей дозы антигена. Так количество IgM-АОК при такой иммунизации в группах животных, получивших дополнительную субоптимальную или оптимальную дозу антигена, достоверно выше контрольного значения (14 682 или 37 846, относительно 5 552). Уровень IgG-ответа в группах животных, проиммунизированных субоптимальной дозой антигена, повышается с 1 187 в контроле до 11 154 и 48 574 (повторное введение субоптимальной и оптимальной доз антигена, соответственно). По-видимому, дополнительное введение антигена в позднюю лог-фазу IgM-ответа вызывает продление действия активации начальных стадий ответа, что приводит к изменению физиологического течения гуморального ответа.

В случае проведения первичной иммунизации оптимальной дозой антигена наблюдается усиление только IgM-ответ и только при повторном введении также большой дозы антигена (с 25 947 до 42 526); уровень IgG-ответа не меняется. Менее выраженный эффект с оптимальной для гуморального ответа дозой может быть связан со снижением влияния дополнительного поступления антигена на фоне длительного пребывания его в организме, введенного изначально в большей дозе.

Резкое возрастание количества IgM-АОК (от 3 до 7 раз) происходит за 1-е сутки до пика IgM-ответа, тогда как поступление дополнительного количества антигена за сутки до пика IgG-ответа (через 8 суток после иммунизации) не меняет число IgG-АОК, а в случае субоптимальной дозы антигена на фоне низкодозовой иммунизации, даже достоверно снижает их количество в два раза (с 1 187 до 625).

Различие в ответе на повторное введение антигена через 4 и 8 суток может быть связано с регулирующим влиянием антител разных классов: идет активная продукция специфических IgM и IgG, соответственно. Известно, что антитела

класса IgM, введенные вместе с корпускулярным антигеном, стимулируют гуморальный иммунный ответ, тогда как антитела класса IgG — подавляют; эффект показан как для пассивно введенных, так и для образующихся в организме антител [10, 11].

Ранее нами было показано, что дополнительное поступление антигена в лог-фазу развивающегося первичного гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген снижает выраженность вторичного ответа у мышей (СВАхС57BL/6)F1 [1]. Учитывая существование генетических особенностей иммунного реагирования, было подтверждено супрессивное влияние антигена на последующий анамнестический гуморальный ответ на мышах другого генотипа — С57В1/6хДВА)F<sub>1</sub>. Оценка эффекта дополнительного введения антигена на формирование вторичного гуморального ответа показала, что количество IgG-АОК на его пике (через 4 суток после вторичной иммунизации) значительно ниже в тех группах животных, которые получили повторную инъекцию антигена в позднюю лог-фазу IgM-ответа. Таким образом, мыши разных генотипов, СВАхС57BL/6)F1 и (С57В1/6хДВА/2)F1, обнаруживают одинаковую закономерность подавления анамнестической реакции при резкой стимуляции первичного ответа, отличие проявляется лишь в выраженности супрессии.

После контакта с антигеном при развертывании первичного ответа В-клетки активируются к пролиферации и дифференцировке в антителопродуценты, причем до стадии плазматической клетки эти процессы идут параллельно [8, 9, 13]. В дальнейшем происходит переключение изотипов иммуноглобулина, образование коротко и долгоживущих плазматических клеток и клеток памяти, миграция клеток в костный мозг и резкое снижение количества антителопродуцентов [3, 5, 6, 7, 14]. Детальная картина и регулирующие факторы некоторых процессов остаются во многом еще до конца не ясными.

Подъем количества клеток-антителопродуцентов при повторном введении антигена в конце лог-фазы, показанный в наших экспериментах, оказывается очень резким, что предполагает участие мощных регуляторных факторов. В качестве одного из возможных механизмов реализации их действия может быть рассмотрена стимуляция пролиферативных процессов В-лимфоцитов, дифференцирующихся в антителопродуценты.

Для изучения роли пролиферативных процессов в стимулирующем эффекте дополнительного поступления антигена и, как следствие, в последующей супрессии гуморальной иммунной памяти, была проведена серия экспериментов с введением гидроксимочевины — ингибитора синтеза ДНК [12]. При введении гидроксимочевины мышам в лог-фазу первичного IgM-ответа через 4 суток после иммунизации одновременно с повторным введением антигена происходит ослабление стимулирующего эффекта в случае IgM-ответа, однако количество IgM-АОК в селезенке остается на достаточно высоком уровне, сравнимом с таковым в

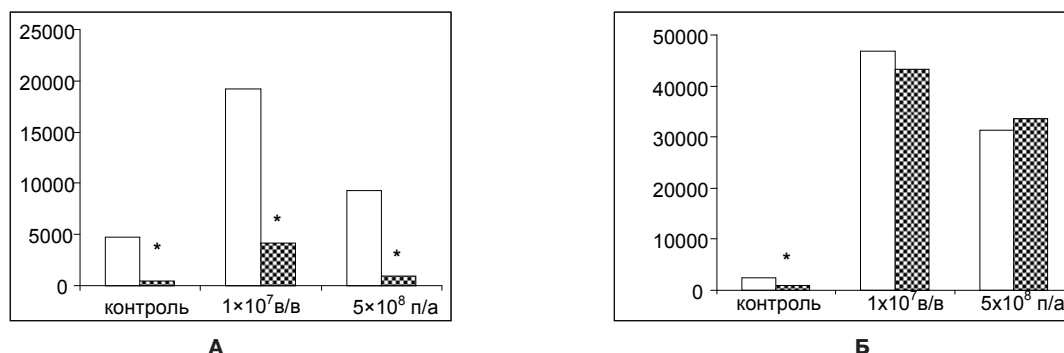
контрольной группе иммунных мышей. Определенные количества IgG-АОК в использованной нами схеме опыта не выявило отмены или снижения стимулирующего эффекта повторного введения антигена. Количество IgG-АОК в селезенке по-прежнему характеризуется резким, более чем 10-кратным подъемом (рис. 1).

Оценка влияния пролиферативной активности антителообразующих клеток селезенки на вторичный IgG-ответ при дополнительном введении антигена в лог-фазу IgM-ответа (через 4 суток после первичной иммунизации) не выявила снижения вторичного иммунного ответа на фоне введения ингибитора синтеза ДНК. Результаты этого эксперимента представлены в таблице 1.

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-е, 8-е, или 10-е сутки первичного иммунного ответа также не приводит к снижению количества IgG-АОК при вторичном ответе (табл. 2).

Таким образом, элиминация пролиферирующих антителопродуцентов в конце лог-фазы развивающегося IgM-ответа оказывает неоднозначный эффект на IgM и IgG-антителообразование в селезенке: полное ограничение подъема IgM-антителообразующих клеток, частичная отмена стимуляции первичного IgG-ответа и абсолютная устойчивость анамнестической реакции к ингибитору пролиферации.

По-видимому, большая часть IgM-АОК при стимуляции повторным введением антигена действительно представлена активно пролиферирующими клетками, либо за счет некоторого укорочения продолжительности клеточного цикла, либо сдерживания выхода клеток из делящегося пула. Однако нельзя забывать 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. Это также могут быть клетки, подвергающиеся апоптозу, но повторное введение антигена может обеспечивать их сигналами для выживания [6, 14].



**Рис. 1.** 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). Примечание: по оси ординат – количество АОК на селезенку; по оси абсцисс: доза дополнительного введения антигена; Белые столбцы – контрольная группа без введения гидроксимочевины (n = 9–11), серые столбцы – опытная группа с введением гидроксимочевины (n = 9–10); \* – достоверные отличия относительно собственного контроля.

**Таблица 1**  
**Количество IgG-АОК в селезенке при вторичном иммунном ответе на фоне введения гидроксимочевины в позднюю лог-фазу IgM-ответа (через 4 суток после первичной иммунизации)**

Доза первичной иммунизации	Дополнительное введение АГ					
	Контроль (без АГ)		1 × 10 <sup>7</sup> в/в		5 × 10 <sup>8</sup> п/а	
	без ГМ	с ГМ	без ГМ	с ГМ	Без ГМ	с ГМ
1 × 10 <sup>7</sup> в/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)

**Таблица 2**  
**Количество IgG-АОК в селезенке при вторичном иммунном ответе на фоне введения гидроксимочевины в позднюю лог-фазу первичного IgG-ответа**

Доза первичной иммунизации	Дополнительное введение ГМ			
	Контроль (без введения ГМ)	6-е сутки	8-е сутки	10-е сутки
1 × 10 <sup>7</sup> в/в ЭБ/мышь	400 169 (n = 12)	493 147 (n = 10)	364 795 (n = 10)	574 556 (n = 5)

Повторное введение антигена в конце лог-фазы развивающегося IgM-ответа также может изменять процессы миграции клеток, а также соотношение антителопродуценты/клетки памяти при дифференцировочных процессах; эти возможные механизмы требуют дальнейшего исследования.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог проделанной работы, можно говорить о том, что дополнительное введение антигена в конце лог-фазы первичного IgM-ответа дает эффект гиперстимуляции как на IgM-, так и на первичный IgG-гуморальный ответ, и приводит к последующей супрессии анамнестической реакции у мышей разного генотипа. Торможение процессов пролиферации на фоне стимуляции первичного ответа (введение гидроксимочевины 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 антителопродуцентов. Элиминация пролиферирующей активности гидроксимочевинной не оказывает влияния на вторичный гуморальный ответ, что вероятно говорит о значимой, но не определяющей роли активнodelящихся в конце лог-фазы В-клеток на формирование иммунной памяти. Скорее всего, стимуляция пролиферативных процессов В-лимфоцитов, дифференцирующихся в антителопродуценты существенно сокращает пул клеток памяти и, как следствие, супрессирует вторичный иммунный ответ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова Е.Д., Кудяева О.Т., Колесникова О.П. Регуляторные взаимодействия между клеточным и гуморальным ответом при формировании иммунной памяти // Вестн. Уральского мед. акад. науки. — 2006. — № 3 — 1. — С. 32 — 35.
2. Гаврилова Е.Д., Кудяева О.Т., Колесникова О.П. Антиген как фактор регуляции синтеза антител в продуктивную фазу иммунного ответа // Омский науч. вестн. — 2007. — Т. 61, № 3. — С. 17 — 18.
3. Гурвич А.Г. Динамика антителообразования // Иммуногенез и клеточная дифференцировка. — М., 1978. — С. 128 — 158.

4. Ahmed R., Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation // Science. — 1996. — Vol. 272. — P. 54 — 60.

5. Batista F.D., Harwood N.E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nature Reviews // Immunology. — 2009. — Vol. 9. — P. 15 — 27.

6. Crowley J.E., Scholz J.L., Quinn W.J. 3rd, Stadanlick J.E. et al. Homeostatic control of B lymphocyte subsets // Immunol. Res. — 2008. — Vol. 42. — P. 75 — 83.

7. Dooms H., Abbas A. Control of CD4+ T-cell memory by cytokines and costimulators // Immunological Reviews. — 2006. — Vol. 211. — P. 23 — 38.

8. Gudat F.G., Harris T.N., Harris S. Studies on antibody-producing cells. 3. Identification of young plaque-forming cells by thymidine-3 H labeling // J. Exp. Med. — 1971. — Vol. 134. — P. 1155 — 1169.

9. Hay J.B., Murphy M.J., Morris B. Quantitative studies on the proliferation and differentiation of antibody-forming cells in lymph // Am. J. Pathol. — 1972. — Vol. 6. — P. 1 — 24.

10. Henry C., Jerne N.K. Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regulation of the primary immune response // J. Exp. Med. 1968. — Vol. 128. — P. 133 — 152.

11. Hjelm F., Carlsson F., Getahun A., Heyman B. Antibody-mediated regulation of the immune response // Scand. J. Immunol. — 2006. — Vol. 64. — P. 177 — 184.

12. Morse B.S., Rencricca N.J., Stohlman F. The effect of hydroxyurea on differentiated marrow erythroid precursors // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1969. — Vol. 130, N 3. — P. 986 — 989.

13. Tangye S.G., Hodgkin P.D. Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B-cell responses // Immunol. — 2004. — Vol. 112. — P. 509 — 520.

14. Tarlinton D., Radbruch A., Hiepe F., Dorner T. Plasma cell differentiation and survival // Current Opinion in Immunology. — 2008. — Vol. 20. — P. 162 — 169.

15. Zinkernagel R.M., Ehl S., Aichele P., Oehen S. et al. Antigen localization regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity // Immunol. Rev. — 1997. — Vol. 156. — P. 199 — 209.

### Сведения об авторах

**Гаврилова Елена Давидовна** — научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат биологических наук (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383) 222-04-38, факс: (383) 222-70-28; e-mail: edav76@mail.ru)

**Кудяева Ольга Тимофеевна** — ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук

**Колесникова Ольга Петровна** — руководитель лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук

**Козлов Владимир Александрович** — директор ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН