

## ДОЛГОЖИВУЩИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА АЛЬФА (1→3) ДЕКСТРАН

Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Комарова Л.В., Сидорова Е.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Резюме.** Целью работы являлось изучение динамики образования и некоторых функциональных свойств долгоживущих клеток костного мозга при иммунизации Т-независимыми антигенами 2-го типа.

Опыты проводили на мышах. В качестве антигена использовали альфа (1→3) декстран. Мышей иммунизировали декстраном и на 0, 4, 14, 28 и 56 дни в костном мозге и селезенке определяли количество IgM<sup>+</sup> антитело-продуцентов. Фенотип клеток определяли цитометрически. В лимфоцитарной зоне нормального костного мозга было выявлено 4% Т- и 80-85% В-лимфоцитов. Наряду с этим было обнаружено ~35% клеток, несущих маркер плазматических клеток – CD138; ~ 3% составляли CD138<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> и ~ 6% – CD138<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> В-лимфоциты. В селезенке на долю Т-клеток приходилось ~50%; В клетки составляли 47%; ~1,5% было представлено CD138<sup>+</sup> и ~0,5% CD138<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> лимфоцитами.

Динамика образования антитело-продуцентов в селезенке и костном мозге мышей при иммунизации декстраном отличалась. В селезенке максимум клеток, секретирующих антитела, выявлялся на 4-й день, к 28-му дню процесс затихал. В костном мозге напротив, на 4-е сутки увеличение числа антитело-продуцентов только начиналось; оно достигало максимума на 14-й день и выходило на стационарный уровень к 28-му.

В опытах *in vitro* было установлено, что внесение Т-независимого антигена в культуру клеток костного мозга, выделенных на 28-й день после иммунизации, на их активность не влияет. Ранее это было показано только для Т-зависимых антигенов.

Специфический маркер долгоживущих плазматических клеток неизвестен. Но для них характерен маркер всех плазматических клеток – CD138. Был отработан метод выделения CD138<sup>+</sup> клеток, из костного мозга, позволяющий получить клетки 87-97%-й чистоты. Антитела, продуцируемые CD138<sup>+</sup> клетками костного мозга, обогащенными долгоживущими клетками, моноспецифичны.

**Ключевые слова:** Т-независимые антигены 2-го типа, альфа (1→3) декстран, костный мозг, CD138<sup>+</sup> плазматические клетки, долгоживущие плазматические клетки, антитело-продуценты

### Адрес для переписки:

Чернышова Ирина Николаевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин  
и сывороток им. И.И. Мечникова»  
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.  
Тел.: 8 (495) 674-08-42.  
E-mail: laboratory.lbi@gmail.com

### Address for correspondence:

Chernyshova Irina N.  
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums,  
Federal State Scientific Institution  
105064, Russian Federation, Moscow,  
Malyy Kazenny Lane, 5a.  
Phone: 7 (495) 674-08-42.  
E-mail: laboratory.lbi@gmail.com

### Образец цитирования:

И.Н. Чернышова, М.В. Гаврилова, Л.В. Комарова,  
Е.В. Сидорова, «Долгоживущие плазматические клетки  
костного мозга при иммунном ответе на альфа (1→3)  
декстран» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2.  
С. 127-134.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-127-134

### For citation:

I.N. Chernyshova, M.V. Gavrilova, L.V. Komarova, E.V. Sidorova,  
“Long-lived bone marrow plasma cells during immune response  
to alpha (1→3) Dextran”, *Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 127-134.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-127-134

© Чернышова И.Н. и соавт., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-127-134>

## LONG-LIVED BONE MARROW PLASMA CELLS DURING IMMUNE RESPONSE TO ALPHA (1→3) DEXTRAN

Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Komarova L.V., Sidorova E.V.

*I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Federal State Scientific Institution, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Production kinetics and some functional properties of long-lived marrow plasma cells were studied in mice immunized with T-independent type 2 antigens. Alpha (1→3) dextran was used as an antigen for immunization. The mice were immunized by dextran, and the numbers of IgM antibody producing cells were determined by ELISPOT method. The cell phenotype was determined by cytofluorimetric technique. In the area of normal bone marrow lymphocytes ~4% of T and ~85% of B cells were detected. About 35% of the cells expressed a plasmocyte marker (CD138); 3% were CD138<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>, and about 6% of the lymphocytes were double-positive for CD138<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup>. Among spleen lymphocytes, 50% of T and 47% of B cells were detected. About 1.5% lymphocytes were CD138<sup>+</sup>, and 0.5% were positive for CD138 and IgM.

Time kinetics of antibody-producing cells in bone marrow and spleen was different. In spleen populations, the peak amounts of antibody-secreting cells have been shown on the day 4; the process abated by the day 28. Vice versa, the numbers of the antibody-producing cells in bone marrow started to increase on the day 4. The process reached its maximum on day 14, and after 28<sup>th</sup> day became stationary. The *in vitro* experiments have shown that supplementation of bone marrow cells from immune mice with dextran did not influence their functional activity. It was previously shown for cells responding to T-dependent antigens only.

A specific marker for the long-lived plasma cells is still unknown. However, these cells possess a common CD138 marker specific for all plasma cells. A method for isolation of bone marrow CD138<sup>+</sup> cells was developed. The CD138<sup>+</sup> cells were of 87-97% purity, being enriched in long-lived bone marrow cells, and produced monospecific antibodies.

*Keywords: T-independent type 2 antigens, alpha (1→3) dextran, bone marrow, CD138<sup>+</sup> plasma cells, long-lived plasmocytes, antibody-producing cells*

### Введение

В последние годы открыта новая стадия дифференцировки В-лимфоцитов – долгоживущие плазматические клетки (дПК) [1]. Эти клетки появляются на 3-4-й неделе после иммунизации, локализуются преимущественно в костном мозге (КМ) и несут специфический маркер плазматических клеток (ПК) – CD138. Предполагается, что в КМ существуют особые ниши, в которых локализуются дПК. Они секретируют антитела (АТ) разных изотипов. При Т-зависимых ответах ни клетки памяти, ни антиген (АГ) для этого не нужны [5, 9, 10]. От «обычных» короткоживущих ПК дПК отличаются сохранением поверхностных Ig. В КМ человека индуцированные АГ дПК выявляются до 50, а у мышей до 2-2,5 лет, что сопоставимо с временем их жизни. Считается, что дПК наряду с В-клетками памяти обеспечивают протективную «гуморальную память». В настоящее время клеточные и молекулярные механизмы образования дПК исследуются в ряде зарубежных лабораторий. Однако, число таких исследований невелико и вопросов пока значительно больше, чем ответов. Так неизвестно, любой ли АГ может индуцировать появление ПК в КМ, что определяет превращение активированного В-лимфоцита в дПК, имеются ли различия

в образовании дПК при ответе на патогенные и непатогенные агенты, имеется ли избирательность и селекция при образовании дПК разной специфичности, существует ли конкуренция в образовании дПК при ответе на АГ одной и разной природы и т.д.

В настоящее время внимание исследователей направлено в основном на изучение дПК к Т-зависимым АГ (ТЗ АГ). Вместе с тем не меньший интерес представляет вопрос о наличии и свойствах дПК к Т-независимым АГ (ТН АГ), входящим в состав многих патогенных бактерий. Этот вопрос, однако, изучен значительно хуже. Исследования такого рода связаны, главным образом, с изучением образования и времени жизни дПК при вакцинации полисахаридными вакцинами и определением протективной активности продуцируемых АТ [11]. Согласно этим исследованиям, существенная роль в образовании длительно существующих протективных АТ к этим АГ принадлежит дПК. Неизвестно, однако, имеются ли какие-либо различия в образовании дПК при ответе на ТН-2 АГ у мышей разных линий, необходим ли ТН-2 АГ для поддержания секреции АТ дПК, моно- или полиреактивны АТ, продуцируемые дПК и т.д.

**Целью настоящей работы** являлось определение динамики образования дПК у мышей разных линий и характеристика некоторых функциональных особенностей дПК костного мозга, образующихся в ответ на иммунизацию бактериальным ТН-2 антигеном – альфа (1→3) декстраном (Декс).

## Материалы и методы

### Животные, антигены

В опытах использовали самок мышей линий СВА и Valb/c, полученных из питомника «Андреевка».

В качестве ТН-2 АГ использовали альфа (1→3) декстран (Декс) *Leuconostoc mesenteroides*, любезно предоставленный доктором М.Е. Преображенской (ФГБУ «ИБМХ» РАМН, Москва), полисахарид *Streptococcus pneumoniae* type 3 (S3), любезно предоставленный проф. J. Humphrey (Великобритания), фиколл 400 (Фик, “Pharmacia”) и поливинилпирролидон (ПВП) с мол. массой 360 кДа (“Sigma”).

### Иммунизация

Мышам линий Valb/c и СВА вводили Декс внутривенно, однократно в дозе 5 мкг/мышь; контрольная группа животных получала физиологический раствор.

### Получение клеток КМ мышей

Клетки КМ после удаления мягких тканей и эпифизов «вымывали» из бедренных костей средой RPMI 1640 с 1% ЭТС. Для получения моноклеточной суспензии ступки клеток КМ пропускали несколько раз через иглу 0,6 × 30 мм.

Эритроциты удаляли гипотоническим шоком. Все операции проводили на холоде. В среднем из 2-х бедренных костей одной мыши выделяли ~12 млн клеток.

### Получение 138<sup>+</sup> ПК костного мозга

ПК выделяли из пулов клеток КМ, полученных от 6-7 нормальных или на 28-й день от иммунизированных Декс мышей методом иммуномагнитной сепарации. Использовали несколько вариантов получения CD138<sup>+</sup> клеток. В первом случае клетки выделяли с помощью набора CD138<sup>+</sup> Plasma Cell Isolation Kit mouse (Miltenyi Biotec, США), согласно протоколу фирмы. Вкратце: клетки КМ, обогащенные ПК, получали, удаляя на LD колонке (Miltenyi Biotec) «не-ПК», меченные коктейлем биотинилированных АТ (к CD49b и CD45R[B220]) и магнитными бусами, содержащими АТ к биотину. Затем обогащенную ПК фракцию клеток инкубировали с покрытыми анти-CD138 АТ магнитными бусами, после чего дважды пропускали через MS колонки (Miltenyi Biotec). Во втором случае клетки КМ сначала обрабатывали биотинилированными анти-CD138 АТ (BD Pharmingen), затем бусами, покрытыми АТ к биотину (Miltenyi Biotec), после чего ПК выделяли на MS колонке [6]. Наконец, третий вариант заключался в одноэтапном выделении ПК с помощью анти-CD138 магнитных бус (Miltenyi Biotec). В этом случае клетки КМ инкубировали с бусами (в 0,5 мл буфера, содержащего ~80 млн клеток и 100 мкл бус) 15 мин при +4 °С и пропускали последовательно через LD и MS колонки. Чистота CD138<sup>+</sup> ПК, согласно данным цитофлуориметрии, составляла 87-97% (рис. 1).

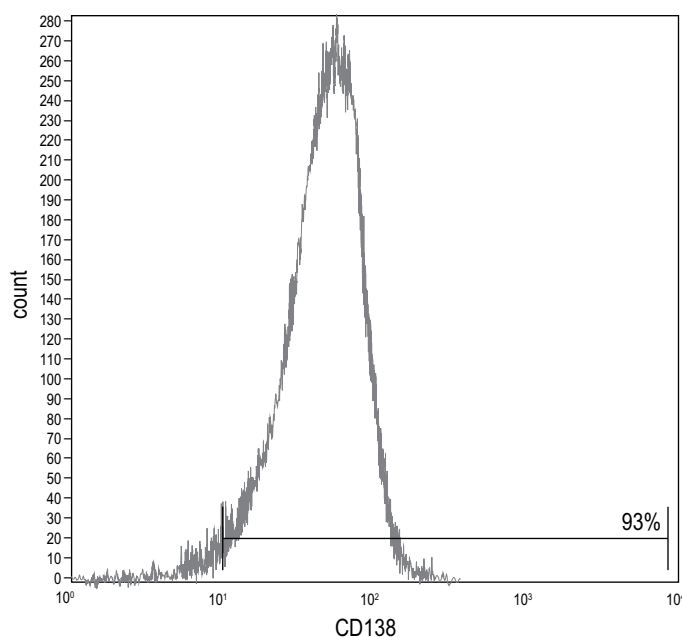


Рисунок 1. CD138<sup>+</sup> клетки, выделенные из костного мозга мышей СВА и окрашенные PE-CD138

### Проточная цитометрия клеток КМ

Для определения клеточного состава КМ использовали меченные флуорохромами АТ к поверхностным маркерам В- и Т-лимфоцитов (BD Pharmingen): АТ к CD3, CD23, IgM, IgA и I-A<sup>k</sup> МНСII, меченные FITC (клоны 17A2, B3B4, 11/41, C10-3 и 11-5.2 соответственно); АТ к CD19, CD5 и CD138, меченные PE (клоны 1D3, 53-7.3 и 281-2 соответственно), и АТ к B220, меченные PE-Cy5 (клон RA3-6B2). Для выявления Декс-специфичных ПК использовали препарат Декс, меченный FITC (FITC-Декс), синтезированный в лаборатории [2]. Анализ клеток проводили на проточном цитометре Beckman Coulter EPICS XL. Результаты анализировали с помощью SYSTEM II (Beckman COULTER, USA).

### Культивирование клеток КМ

В опытах по изучению роли АГ в функциональной активности дПК, индуцированных Декс, клетки КМ (5 млн/лунку) иммунизированных Декс за 28 дней до опыта мышей СВА (7 мышей/группу) культивировали в 24-луночных планшетах (Nunc) в 1 мл среды RPMI 1640 с 10% ЭТС и всеми необходимыми добавками в течение 4-х дней в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С с АГ и без. Декс добавляли к клеткам в концентрациях 10 и 100 нг/мл.

### Клеточный иммуноферментный анализ (ELISPOT)

Количество продуцентов АТ (АОК) в КМ, селезенке и в выделенных CD138<sup>+</sup> клетках КМ определяли методом ELISPOT на разные сроки после введения антигена (0, 4, 14, 28, 56 дни).

Для проведения реакции использовали нитроцеллюлозные планшеты (МАНА N4510, Millipore). Фильтры сенсibilизировали Декс, S3 и Фик – 10 мкг/лунку в цитратно-фосфатном буфере рН 5,0 и ПВП -1 мкг/лунку в фосфатно-солевом буфере рН 7,4. После блокирования фильтров 1% бычьим сывороточным альбумином в лунки вносили 1-2 × 10<sup>6</sup> клеток КМ, 15 × 10<sup>4</sup> CD138<sup>+</sup> клеток КМ или 1 × 10<sup>5</sup> спленоцитов на фильтр. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с 1% ЭТС в течение 12-18 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при +37 °С. Для определения изотипа секретируемых АТ после удаления клеток фильтры инкубировали с биотинилированными АТ к IgM, IgA и IgG мыши (Invitrogen) и стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Invitrogen). По окончании реакции подсчитывали количества «плаков» на фильтрах (число IgM-, IgA- и IgG-АОК) и пересчитывали их на 10<sup>6</sup> клеток.

### Статистическая обработка результатов

Результаты экспериментов представлены в виде средних арифметических значений со стандартными отклонениями (M±SD). Досто-

верность различий результатов между группами нормальных и иммунизированных животных исследовали при помощи дисперсионного анализа. Различия рассматривались как значимые при p < 0,05.

## Результаты

### Фенотипическая и функциональная характеристика клеток КМ и селезенки мышей

Поскольку в литературе нам не удалось найти данных о фенотипе ПК в КМ нормальных и иммунизированных полисахаридами (ТН-2 АГ) мышей, было решено определить поверхностные маркеры ПК селезенки и КМ у мышей СВА в норме и на 28-й день после иммунизации Декс. Согласно данным проточной цитометрии, в лимфоцитарной зоне КМ, составляющей в среднем около 30%, содержалось ~4% Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) и 80-85% В-клеток (CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>); из последних ~13% составляли IgM<sup>+</sup> и ~20% IgA<sup>+</sup> клетки. (IgG-фенотип не определяли). Наряду с этим в лимфоцитарной зоне было выявлено ~35% клеток, несущих маркер ПК – CD138; ~3% составляли CD138<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> и ~6% – CD138<sup>+</sup>IgA<sup>+</sup> В-лимфоцитов. Таким образом, количество CD138<sup>+</sup> клеток в «нормальном» КМ существенно превышало число клеток, экспрессирующих поверхностные IgM и IgA.

В селезенке наблюдалось другое соотношение клеточных популяций. Лимфоцитарная зона занимала 75-80% всех клеток селезенки. На долю Т-клеток приходилось ~50%; В-клетки составляли 47%, ~1,5% экспрессировали маркер CD138 и ~0,5% CD138<sup>+</sup>IgM. Таким образом, в селезенке неиммунизированных мышей СВА выявлялось значительно меньше плазматических клеток, чем в КМ.

Специфический маркер дПК неизвестен, однако они, как и «обычные» короткоживущие ПК, обладают CD138 маркером. Поскольку иммунизация мышей Декс должна приводить к увеличению числа CD138<sup>+</sup> клеток, следовало определить их количества в КМ и селезенке на 28-й день после введения мышам Декс. Для этого клетки КМ и селезенки нормальных и иммунизированных мышей (пулы от 6-7 животных) обрабатывали мечеными АТ к CD138. Кроме того, в КМ и селезенке определяли содержание CD138<sup>+</sup> клеток, экспрессирующих маркеры B220, МНСII, IgM и CD19, для чего клетки обрабатывали мечеными АТ к CD138 в комбинации с АТ к другим маркерам. Оказалось, что общее содержание CD138<sup>+</sup> клеток в КМ и селезенке через 28 дней после иммунизации Декс практически не отличается от нормы (~35% в КМ и ~1,5% в селезенке). Не было выявлено также достоверных различий

в количествах нормальных и «иммунных» клеток, экспрессирующих другие маркеры. В то же время определение содержания клеток с помощью двойного окрашивания показало, что содержание CD138<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> ПК в КМ через месяц после иммунизации снизилось с 31 до 24%, а содержание CD138<sup>+</sup>МНСII<sup>+</sup> (~10%) и CD138<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> ПК (~3%) не изменилось.

На следующем этапе о появлении дПК судили, используя функциональный тест – образование антитело-продуцентов (АОК) клетками КМ и селезенки при иммунизации Декс.

#### Динамика образования дПК, продуцирующих АТ к альфа (1→3) декстрану

Содержание Декс-специфичных АОК в КМ неиммунизированных мышей СВА не превышало ~11 IgM<sup>+</sup> и ~10 IgA<sup>+</sup> АОК на млн клеток. В селезенке количество IgM-АОК оказалось выше (~60/млн спленоцитов), а число IgA-АОК в КМ и селезенке было примерно одинаковым (~11/млн клеток). IgG-АОК к Декс ни в КМ, ни в селезенке выявлено не было. Аналогичные данные были получены в опытах на мышях линии BALB/c.

Для изучения динамики появления АОК в КМ и селезенке мышей BALB/c (по 3 мыши на каждый срок) иммунизировали Декс и на 4, 14, 28 и 56-й дни определяли содержание IgM-, IgA- и IgG-АОК. Результаты экспериментов (средние из 3-х опытов) представлены на рисунках.

Как видно из рисунка 2, число IgM-АОК в КМ повышалось, начиная с 4-го дня. На 14-й день после иммунизации их количество увеличилось вдвое по сравнению с исходным уровнем и достигало ~24/млн клеток КМ, на 28-й день число АОК несколько снижалось и оставалось

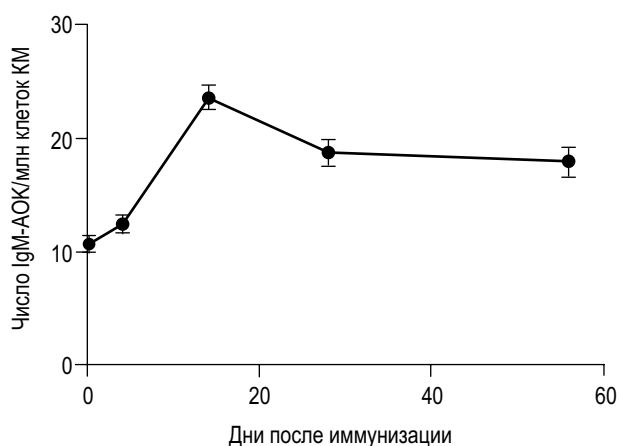


Рисунок 2. Динамика образования АОК, продуцирующих IgM-АТ к Декс, в костном мозге мыши

в период наблюдения (до 56-го дня после иммунизации) на том же уровне (~18/млн). Количество IgA-АОК к Декс в те же сроки практически не менялись, сохраняясь на уровне нормальных значений.

Другая картина наблюдалась в селезенке мышей (рис. 3). При иммунизации Декс максимальное количество IgM-АОК выявлялось на 4-е сутки – 677±117/млн спленоцитов; к 14 дню их число снижалось в 3 раза и составляло 223±47/млн, на 28 день количество АОК сохранялось примерно на том же уровне – 245±28/млн. К 56-му дню число IgM-АОК снижалось до 125±15/млн, оставаясь тем не менее выше исходного уровня (62±11/млн). На число IgA-АОК в эти же сроки иммунизация Декс не влияла; IgG-АОК обнаружить практически не удалось (1-2/млн клеток селезенки).

Различия в динамике появления IgM-АОК в КМ и селезенке мышей и сохранение в КМ повышенного по сравнению с нормой числа IgM-АОК на 28-56 дни после введения Декс указывают на их принадлежность к дПК.

#### Выявление и выделение ПК, специфичных к Декс

Очевидно, что наибольший интерес представляет определение и изучение не просто CD138<sup>+</sup> ПК, но дПК, специфичных в отношении Декс. Для их выявления предполагалось использовать двойное окрашивание клеток КМ и селезенки нормальных и иммунизированных Декс мышей. Однако в предварительных опытах с клетками, инкубированными только с FITC-Декс (1-10 мкг/млн клеток 30 мин при +4 °С), оказалось, что в этих условиях FITC-Декс связывается клетками КМ и селезенки неспецифически.

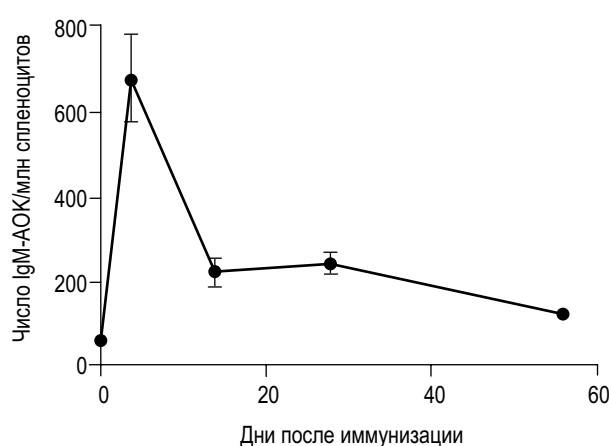


Рисунок 3. Динамика образования АОК, продуцирующих IgM-АТ к Декс, в селезенке мыши

Изучение свойств дПК требует их выделения. Сначала для этих целей мы использовали набор “CD138<sup>+</sup> Plasma Cell Isolation Kit, mouse” (Miltenyi Biotec, США). CD138<sup>+</sup> ПК выделяли из КМ нормальных и иммунизированных Декс мышей СВА на 28-й день после иммунизации, согласно протоколу фирмы. Максимальное количество CD138<sup>+</sup> ПК, которое удавалось получить из клеток КМ мышей, не превышало 0,082 млн. Чистота выделенных CD138<sup>+</sup> клеток составила 65%. Использование альтернативного 2-этапного способа выделения ПК (см. материалы и методы) также не позволило получить достаточного количества CD138<sup>+</sup> ПК, а чистота фракции в этом случае вообще не превышала 40%. Низкий выход и недостаточная чистота выделяемых ПК не позволяли перейти к изучению их свойств. Поэтому было решено использовать одноэтапное позитивное выделение клеток с помощью CD138 MicroBeads (Miltenyi Biotec). В результате из суспензии клеток КМ мышей СВА удавалось выделять до 3 млн CD138<sup>+</sup> ПК (данные 4-х опытов). Согласно данным цитометрии, 97% выделенных клеток относились к В-лимфоцитам. Чистота CD138<sup>+</sup> клеток колебалась от 87 до 97%.

Полученные данные позволили перейти к определению числа АОК, продуцирующих АТ к Декс, не в тотальных клеточных популяциях, а в CD138<sup>+</sup> клетках. В выделенных CD138<sup>+</sup> В-клетках КМ число IgM-АОК к Декс в норме составляло 131±35/млн CD138<sup>+</sup> клеток, при иммунизации оно возрастало до 352±93/млн. Таким образом, у иммунизированных Декс мышей СВА в КМ на 28 день обнаруживалось в 2,7 раза больше АОК к Декс, чем у неиммунизированных животных. Обогащение В-клеток КМ CD138<sup>+</sup> ПК, наряду с увеличением в них числа АОК в отдаленные после иммунизации сроки свидетельствуют о появлении в КМ дПК, продуцирующих АТ к Декс.

#### Роль ТН-2 АГ в жизнедеятельности дПК

Известно, что на дПК к ТЗ АГ сохраняются поверхностные Ig. Недавно было показано наличие дПК с высокой экспрессией IgM (IgM<sup>high</sup>) при ответе на бактериальный ТН-2 АГ [8]. Представлялось интересным определить, играют ли поверхностные Ig роль в функциональной активности дПК и отвечают ли эти клетки на ТН-2 АГ. С этой целью клетки КМ от иммунизированных за месяц до опыта мышей СВА культивировали в полной среде с добавлением Декс или без АГ в течение 4 суток в СО<sub>2</sub>-инкубаторе. По окончании инкубации в клеточных суспензиях определяли количество IgM-АОК, продуцирующих АТ к Декс.

В культурах клеток КМ, выделенных от иммунизированных мышей, число АОК составляло

**ТАБЛИЦА 1. ЧИСЛО КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ АТ К ДЕКС И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМ ТН-2 АГ, В КМ НОРМАЛЬНЫХ И ИММУНИЗИРОВАННЫХ ДЕКС МЫШЕЙ СВА**

Клетки КМ	Число IgM-АОК к ТН-2 АГ/млн CD138 <sup>+</sup> клеток:			
	Декс	S3	Фик	ПВП
«нормальные»	164±45	115±18	160±37	595±52
иммунные	398±98	126±37	149±20	586±71

27-29 на млн клеток. При внесении Декс в такие культуры число АОК не превышало 27-32 на млн клеток. Полученные данные позволяют заключить, что Декс на секрецию АТ индуцированных им дПК не влияет.

#### Специфичны ли АТ к Декс, продуцируемые дПК?

Поскольку известно, что АТ к ТН-2 АГ синтезируются в основном В-1 клетками, которые часто секретируют полиреактивные Ig, было интересно выяснить, обладают ли полиреактивностью АТ к Декс, продуцируемые дПК. Для этого из КМ иммунизированных Декс и нормальных мышей СВА выделяли CD138<sup>+</sup> клетки. В суспензиях этих клеток определяли число IgM-АОК к Декс и к посторонним ТН-2 АГ – полисахариду пневмококка (S3), Фиколлу (Фик) и поливинилпирролидону (ПВП). Результаты представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, на 28 день после введения Декс в КМ мышей СВА число клеток, секретирующих АТ к Декс, увеличилось по сравнению с нормой примерно в 2,4 раза. В то же время на число клеток, секретирующих АТ к гетерологичным ТН-2 АГ, иммунизация Декс не повлияла: количества выявляемых АОК к S3, Фик и ПВП в КМ в иммунной группе остались ~ на исходном уровне. Это значит, что иммунизация мышей Декс (ТН-2 АГ) вызывает появление в КМ дПК, продуцирующих монореактивные АТ, специфичные к Декс.

#### Обсуждение

Как известно, длительное образование АТ (иммунная память) в значительной степени обеспечивается дПК костного мозга [1]. В настоящее время внимание исследователей направлено в основном на изучение дПК, продуцирующих АТ к Т-зависимым АГ (ТЗ АГ). Недавно показано, однако, что бактериальные полисахариды с альфа (1→3) глюкозидными связями, также индуцируют в КМ появление дПК [4, 11]. Этот вопрос, однако, изучен значительно хуже. Исследования такого рода связаны, главным образом,

с изучением образования и времени жизни дПК при вакцинации полисахаридными вакцинами и определением протективной активности продуцируемых АТ [11]. Вместе с тем свойства и функциональная активность самих дПК практически не исследованы. В задачу нашей работы входило изучение некоторых параметров дПК, синтезирующих АТ к альфа (1→3) декстрану *Leuconostoc mesenteroides* (Декс).

Насколько нам известно, фенотип ПК КМ, секретирующих АТ к ТН-2 АГ, до сих пор определен только в одном случае – при хронической инфекции мышей *Ehrlichia muris* [8]. Мы попытались определить некоторые фенотипические характеристики ПК КМ и селезенки при нормальных физиологических условиях.

Сравнительный фенотипический анализ показал, что в норме ~35% клеток лимфоцитарной зоны КМ мышей СВА и BALB/c экспрессируют маркер ПК – CD138. В эту фракцию входят как зрелые ПК, так и плазмобласты. Поскольку ТН-2 АГ индуцируют в основном IgM-ответ, очевидно, что дПК, секретирующие АТ к Декс, входят в пул CD138<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> ПК, составляющий около 3% лимфоцитарной зоны КМ. CD138<sup>+</sup> и CD138<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> клеток в нормальной селезенке оказалось значительно меньше, чем в КМ. Эти данные подчеркивают важную роль ПК КМ в обеспечении организма гуморальной защитой.

Выявить увеличение числа CD138<sup>+</sup> клеток в КМ и селезенке после иммунизации Декс не удалось. Содержание CD138<sup>+</sup> клеток на всех исследованных сроках не отличалось от нормы (~35% в КМ и ~1,5% в селезенке). По-видимому, это объясняется крайне низким содержанием дПК, секретирующих АТ к ТН-2 АГ, не позволяющим «заметить» увеличение числа CD138<sup>+</sup> ПК после иммунизации. Тем же, по-видимому, можно объяснить и отсутствие явных изменений в содержании клеток, окрашивающихся АТ к другим поверхностным маркерам.

С чем связано резкое (в 10 раз) преобладание в лимфоцитарной зоне КМ числа клеток, экспрессирующих CD138 (~30%), но не экспрессирующих IgM? Известно, что на зрелых ПК снижена поверхностная экспрессия IgM [4, 8], что не позволяет выявлять эти клетки, как IgM-позитивные. Таким образом, часть CD138<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> клеток может относиться к короткоживущим ПК, часть – к ПК, продуцирующим IgG или IgA (АОК, продуцирующих IgG к Декс в наших опытах обнаружено не было). Наконец, экспрессирующие CD138 (syndecan-1) клетки могут быть представлены пре-В-клетками КМ [7, 12].

Динамика образования дПК, о которой судили по числу появляющихся АОК, оказалась одинаковой у мышей разных линий – СВА и BALB/c.

Наличие IgM-АОК в отдаленные сроки после иммунизации (56 дней) свидетельствуют об их принадлежности к дПК. Таким образом, данные, полученные в этой серии опытов, подтверждают опубликованные ранее результаты [4].

Очевидно, что для изучения свойств и функциональной активности дПК, индуцированных Декс, требуется выявление и выделение клеток, специфичных к Декс. К сожалению, попытка выявления в КМ 138<sup>+</sup> ПК, синтезирующих АТ к Декс, с помощью двойного окрашивания АТ к CD138, меченными фикоэритрином, и FITC-Декс оказалась неудачной. Связывание клетками FITC-Декс было обусловлено неспецифической сорбцией FITC-Декс. Опыты по выявлению CD138<sup>+</sup> ПК, специфичных к Декс, продолжаются.

Описанные в литературе методы выделения ПК не позволили нам получить достаточные для исследования количества CD138<sup>+</sup> ПК высокой чистоты. Поэтому мы использовали одноэтапное позитивное выделение клеток с помощью анти-CD138 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Использованный подход позволил обогатить клетки КМ CD138<sup>+</sup> ПК и показать, что число IgM-АОК, продуцирующих АТ к Декс, на 28 день после иммунизации возрастает в 2,7 раза.

На дПК к ТН-2 АГ обнаруживается экспрессия IgM [8]. С чем это связано и имеет ли это какое-то функциональное значение, неизвестно. В опытах с дПК, продуцирующими АТ к ТЗ АГ, было показано, что АГ не влияют на деятельность дПК [5, 9, 10]. Относительно ТН-2 АГ таких данных нет. Проведенное нами изучение влияния Декс на функциональную активность дПК в опытах *in vitro* показало, что внесение АГ в культуры клеток, взятых на 28 день после иммунизации (т.е. содержащих дПК), на количества АОК не влияет. Эти данные дополняют результаты, полученные ранее в опытах с ТЗ АГ, и свидетельствуют о том, что в деятельности дПК, образующихся в ответ на ТН АГ, как и в деятельности дПК, индуцированных ТЗ АГ, дополнительная стимуляция АГ роли не играет.

На ТН-2 АГ отвечают главным образом В1-клетки, значительная часть которых конститутивно секретирует полиреактивные АТ [3]. Чтобы проверить, являются ли АТ, секретируемые CD138<sup>+</sup> ПК, индуцированными Декс, моно- или полиреактивными, определяли количества АОК к использованному для иммунизации Декс и посторонним ТН-2 АГ – S3, Фик и ПВП. Выявление ответа только на гомологичный АГ – Декс – свидетельствует о том, что иммунизация мышей Декс вызывает появление в КМ дПК, секретирующих монореактивные АТ.

## Заключение

Все вышеизложенное позволяет заключить, что Декс (ТН-2 АГ) индуцирует в КМ мышей появление дПК, динамика образования которых у мышей линий СВА и BALB/с практически одинакова. На «стационарный» уровень процесс выходит ~ через 28 дней. дПК, образовавшиеся в ответ на введение Декс, для длительного об-

разования АТ, по-видимому, не нуждаются в дополнительной стимуляции специфическим АГ. Для окончательного вывода, однако, требуются дополнительные опыты, поскольку Декс долго персистирует в организме и может стимулировать как «новые» В1-клетки, так и IgM-клетки памяти. АТ, продуцируемые дПК к Декс, являются монореактивными.

## Список литературы / References

1. Сидорова Е.В. Долгоживущие В-клетки // Успехи современной биологии, 2013. Т. 133, № 4. С.333-348. [Sidorova E.V. Long-lived B cells. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2013, Vol. 133, no. 4, pp. 333-348. (In Russ.)]
2. Хоченков Дм.А. Роль дендритных клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены типа 2 // Биологические мембраны, 2010. Т. 27, № 4. С.307-313. [Khochenkov D.A. Role of dendritic cells in the immune response to T-independent antigens type 2. *Biologicheskie membrany = Biochemistry (Moscow) Supplement Series A*, 2010, Vol. 27, no. 4, pp. 307-313. (In Russ.)]
3. Choi Y.S., Dieter J.A., Rothausler K., Luo Z., Baumgarth N. B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 1, pp. 120-129.
4. Foote J.B., Mahmoud T.I., Vale A.M., Kearney J.F. Long-term maintenance of polysaccharide-specific antibodies by IgM-secreting cells. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 1, pp. 57-67.
5. Manz R.A., Löhning M., Cassese G., Thiel A., Radbruch A. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int. Immunol.*, 1998, Vol. 10, no. 11, pp. 1703-1711.
6. Heather A., Minges Wols, Pamela L. Witte. Plasma cell purification from murine bone marrow using a two-step isolation approach. *J. Immunol. Meth.*, 2008, Vol. 329, no. 1-2, pp. 219-224.
7. Kopper L., Sebestyen A., Gallai M., Kovalszky I. Syndecan-1 – a new piece in B-cell Puzzle. *Pathology Oncology Research*, 1997, Vol. 3, no. 3, pp. 183-191.
8. Racine R., McLaughlin M., Jones D.D., Wittmer S.T., MacNamara K.C., Woodland D.L., Winslow G.M. IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 2, pp. 1011-1021.
9. Slifka M.K., Antia R., Whitmire J.K., Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*, 1998, Vol. 8, no. 3, pp. 363-372.
10. Slifka M.K., Matloubian M., Ahmed R. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J. Virol.*, 1995, Vol. 69, no. 3, pp. 1895-1902.
11. Taillardet M., Haffar G., Mondière P., Asensio M.J., Gheit H., Burdin N., Defrance T., Genestier L. The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 20, pp. 4432-4440.
12. Tung J.W., Mrazek M.D., Yang Y., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2006, Vol. 103, no. 16, pp. 6293-6298.

### Авторы:

**Чернышова И.Н.** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Гаврилова М.В.** – научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Комарова Л.В.** – младший научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Сидорова Е.В.** – д.б.н., профессор, заведующая лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

### Authors:

**Chernyshova I.N.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Federal State Scientific Institution, Moscow, Russian Federation

**Gavrilova M.V.**, Research Associate, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Federal State Scientific Institution, Moscow, Russian Federation

**Komarova L.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Federal State Scientific Institution, Moscow, Russian Federation

**Sidorova E.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Federal State Scientific Institution, Moscow, Russian Federation

Поступила 13.01.2015  
Принята к печати 14.01.2015

Received 13.01.2015  
Accepted 14.01.2015