

РАННЯЯ ПРОДУКЦИЯ IgE СВЯЗАНА С НАКОПЛЕНИЕМ CD11b⁺ КЛАССИЧЕСКИХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И CD11b⁺CD11c⁻ МАКРОФАГОВ В ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

**Чудаков Д.Б., Коновалова М.В., Коцарева О.Д., Шевченко М.А.,
Стрельцова М.А., Сергеев А.А., Фаттахова Г.В.**

*ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук, Москва, Россия*

Резюме. В связи с увеличением частоты возникновения IgE-опосредованных патологий как в России, так и в мире, внимание различных исследовательских групп приковано к изучению механизмов, запускающих процесс переключения В-лимфоцитов на IgE при попадании в организм безвредных аллергенов, а также к изучению роли различных типов антигенпрезентирующих клеток (АПК) в этом процессе. Однако роль различных АПК в презентации попадающих за барьер в течение длительного времени низких доз антигена и специфика данных процессов при попадании антигена через подкожную жировую клетчатку, содержащую тканеассоциированные лимфоидные кластеры (ТАЛК), изучена плохо. Целью настоящей работы являлось определение связи накопления локально в подкожной жировой ткани различных типов АПК и формирования ранней продукции IgE в клинически релевантной модели аллергии, предполагающей длительное введение низких доз аллергена. Данная модель обуславливает формирование продукции специфического IgE при минимальной сопутствующей продукции IgG, что имитирует ситуацию, наблюдаемую у больных с аллергией в клинической практике.

Мыши линии BALB/c были иммунизированы в течение 4 недель подкожно в область холки или внутрибрюшинно низкими (100 нг) или высокими (10 мкг) дозами модельного аллергена овальбумина. Через каждые 7 дней у мышей отбирали образцы крови для получения сывороток и для определения продукции специфических антител методом иммуноферментного анализа (ИФА), проводили провокацию высокой дозой аллергена и получали образцы жировой ткани в месте введения антигена для анализа содержания различных субпопуляций АПК методом проточной цитометрии.

Продукция специфического IgE формировалась в основном при введении антигена в низких (100 нг) дозах подкожно, в область холки. В работе наблюдали накопление в жировой ткани области холки, но не в интраперитонеальной жировой ткани, CD11b⁺ классических, но не CD11b⁻ классических, воспалительных или плазмациитоидных, дендритных клеток, совпадающее с моментом усиления про-

Адрес для переписки:

*Чудаков Дмитрий Борисович
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел./факс: 8 (499) 330-40-11.
E-mail: boris-chudakov@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Dmitry B. Chudakov
M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences
117997, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maclay str., 16/10.
Phone/fax: +7 (499) 330-40-11.
E-mail: boris-chudakov@yandex.ru*

Образец цитирования:

*Д.Б. Чудаков, М.В. Коновалова, О.Д. Коцарева,
М.А. Шевченко, М.А. Стрельцова, А.А. Сергеев,
Г.В. Фаттахова «Ранняя продукция IgE связана
с накоплением CD11b⁺ классических дендритных
клеток и CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов в подкожной
жировой ткани» // Медицинская иммунология, 2022.
Т. 24, № 6. С. 1189-1204.
doi: 10.15789/1563-0625-EIP-2560*

© Чудаков Д.Б. и соавт., 2022
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

*D.B. Chudakov, M.V. Konovalova, O.D. Kotsareva,
M.A. Shevchenko, M.A. Strelitsova, A.A. Sergeev,
G.V. Fattakhova "Early IgE production is associated with
accumulation of CD11b⁺ classical dendritic cells and
CD11b⁺CD11c⁻ macrophages in subcutaneous adipose tissue",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1189-1204.
doi: 10.15789/1563-0625-EIP-2560*

© Chudakov D.B. et al., 2022
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EIP-2560

дукции специфического IgE на 14-21-е сутки. Накопление CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов и их CD206⁺ M2-субпопуляции на ранние сроки (7-е и 21-е сутки) также наблюдали только при введении антигена подкожно в область холки. Введение высоких (10 мкг) доз антигена, опосредующих формирование продукции IgG₁ в большей степени, чем IgE, приводило к более ранней индукции накопления CD11b⁺ классических дендритных клеток (на 7-е сутки) и отсутствию накопления макрофагов на более поздних стадиях (21-е сутки).

Таким образом, ранний запуск продукции специфического IgE при попадании низких доз антигена в подкожную жировую ткань может быть связан с его презентацией CD11b⁺ классическими дендритными клетками в присутствии CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов.

Ключевые слова: IgE, гиперчувствительность I типа, низкие дозы антигена, подкожная жировая ткань, антигенпрезентирующие клетки, CD11b⁺ классические дендритные клетки, макрофаги, M2-макрофаги, проточная цитометрия, лабораторные животные

EARLY IgE PRODUCTION IS ASSOCIATED WITH ACCUMULATION OF CD11b⁺ CLASSICAL DENDRITIC CELLS AND CD11b⁺CD11c⁻ MACROPHAGES IN SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE

Chudakov D.B., Konovalova M.V., Kotsareva O.D., Shevchenko M.A., Streltsova M.A., Sergeev A.A., Fattakhova G.V.

M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. In view of increased incidence of IgE-mediated diseases in Russia and worldwide, the efforts of various research groups are focused on studying the mechanisms that trigger the process of switching B-lymphocytes to IgE synthesis upon human exposure to harmless allergens, including the role of various antigen-presenting cells (APCs) in this process. However, the role of distinct APCs upon long-term penetration of low antigen doses *via* the tissue barriers, is yet poorly understood, as well as specific features of these events upon entrance of the antigen through the subcutaneous adipose tissue which contains tissue-associated lymphoid clusters (TALC). The aim of this work was to determine the relationship between the local accumulation of various APCs in the subcutaneous adipose tissue and development of early IgE production in a clinically relevant experimental model of allergy with long-term administration of low allergen doses. In this experimental model, specific IgE synthesis is induced, with minimal concomitant IgG production, thus mimicking the situation observed in patients with clinically sound allergies. BALB/c mice were immunized for 4 weeks subcutaneously in the withers area or intraperitoneally with low (100 ng) or high (10 µg) doses of the model allergen (ovalbumin). Blood samples were taken weekly from mice for ELISA testing, to determine the production of specific antibodies. Provocation tests were performed with high dose of the allergen, and adipose tissue samples were taken from the site of antigen injection for flow cytometric assays, in order to evaluate the contents of various APC subpopulations. Specific IgE production was induced mainly by subcutaneous injection of the antigen at low doses (100 ng) into the area of withers. When using this experimental regimen, we observed accumulation of classical CD11b⁺ cells in adipose tissue at the withers site, but not in the peritoneal adipose tissue, in absence of CD11b⁻ classical, inflammatory or plasmacytoid, dendritic cells. These findings coincided in time with increased production of specific IgE on days +14 to +21. Accumulation of CD11b⁺CD11c⁻ macrophages and their CD206⁺ M2 subpopulations at early terms (days +7 and +21) was also observed only after subcutaneous injection of the antigen into the withers area. The high-dose antigen injection (10 µg) which mediated IgG₁ production to greater extent than production of IgE, led to earlier accumulation of CD11b⁺ classical dendritic cells (on day 7th), and to the absence of macrophage accumulation at later stages (day 21th). Thus, the early start of specific IgE production upon low-dose injection of the antigen into the subcutaneous adipose tissue may be associated with its presentation by CD11b⁺ classical dendritic cells in the presence of CD11b⁺CD11c⁻ macrophages.

Keywords: IgE, type I hypersensitivity, low-dose antigen, subcutaneous fat tissue, antigen-presenting cells, CD11b⁺ classical dendritic cells, macrophages, M2 macrophages, flow cytometry, laboratory animals

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-05-50064.

Введение

Проблема, связанная с ростом частоты возникновения IgE-опосредованных иммунопатологий, к которым относятся бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит, гиперчувствительность на ряд продуктов питания, является актуальной как в России, так и за рубежом [1, 24]. Несмотря на длительное изучение процессов формирования продукции IgE при попадании в организм безвредных аллергенов, механизмы, инициирующие синтез IgE В-лимфоцитами, во многом остаются неизвестными [24].

Одним из многих аспектов, вокруг которых ведутся дискуссии, является участие различных типов антигенпрезентирующих клеток в запуске продукции IgE. Ряд исследований подтверждают роль дендритных клеток и макрофагов на поздних стадиях аллергического воспаления [2, 5, 12, 18, 23, 25]. Профессиональные антигенпрезентирующие клетки (АПК) несомненно играют роль на ранних стадиях при запуске продукции IgE [12, 18, 23, 25]. Однако до конца неясно, какой тип АПК является наиболее важным в индукции состояния сенсилизации. Большинство исследователей полагают, что наиболее важную роль в запуске продукции аллерген-специфических антител играют дендритные клетки, а именно – CD11b⁺ классические (т. е. формируемые из костномозговых предшественников) дендритные клетки, отвечающие за начальные этапы трафика антигена [23]. Подобные дендритные клетки легких при взаимодействии с Т-хелперами 0 (Th0) склонны к индукции поляризации последних в Т-хелперы 2 (Th2) [12]. Этот процесс зависит от экспрессии на поверхности дендритных клеток костимуляторных молекул, таких как CD80, CD86, OX40L, которая регулируется цитокинами, выделяемыми при повреждении тканей – IL-33, TSLP (тимическим стромальным лимфопоэтином) и в меньшей степени IL-25 [1, 4, 6]. В то же время CD11b⁻ классические дендритные клетки, имеющие иной профиль экспрессии генов и поверхностных ко-стимуляторных молекул, при активации склонны стимулировать формирование анти-аллергических Т-хелперов 1 (Th1) [25].

Помимо классических дендритных клеток в трафике антигена, поступающего через барьерные ткани, могут принимать участие воспалительные дендритные клетки [23]. Этот тип дендритных клеток характеризуется наличием поверхностной экспрессии высокоаффинного FcεRI рецептора для IgE (и способностью соот-

ветственно транспортировать иммунные комплексы аллергена и IgE) и CD64 [18, 25]. Воспалительные дендритные клетки дифференцируются из моноцитов [18]. Их дифференцировка связана с наличием воспалительных цитокинов, либо некоторых аларминов, например внеклеточной ДНК [16, 18]. Популяция плазмацитоидных дендритных клеток характеризуется экспрессией маркера B220 и секрецией интерферонов I типа. Эти клетки обладают слабой способностью к презентации антигена и обычно ингибируют развитие иммунологических реакций [18, 25].

Хотя макрофаги и В-лимфоциты также относятся к профессиональным АПК, принято считать, что индуцировать первичную активацию наивных Т- и В-лимфоцитов они не могут, а участвуют на более поздних стадиях или во вторичном иммунном ответе [20]. Несмотря на это, данные некоторых работ позволяют утверждать, что макрофаги и В-лимфоциты также могут служить первичными АПК (антигенпрезентирующими клетками) [9, 13, 19]. Кроме того, продуцируя провоспалительные цитокины, такие как IL-6 и TNFα, макрофаги могут опосредованно поддерживать формирование аллергического воспаления и продукцию антител [2, 3]. Особый подтип активированных макрофагов – M2-макрофаги, отличающиеся экспрессией CD206, продуцирует иммуносупрессорные цитокины IL-10, TGF-β1, а также FIZZ1 (Found in inflammatory zone 1, «Найденный в зоне воспаления продукт 1»), иначе называемый RELM1α (Resistin-like molecule α, «Резистин-подобный продукт α»), необходимый для ремоделирования эпителиального барьера, что также влияет на ход аллергического воспаления [10].

Основные работы, в которых изучали роль разных типов АПК в трафике и презентации антигена при первичном ответе на аллерген, выполнены на моделях аллергии с использованием высоких доз аллергена и (или) адьювантов, в которых продукция IgE сопровождается существенной продукцией специфического IgG [8, 12, 13, 23]. Ранее нами была предложена модель аллергии на лабораторных мышах линий BALB/c и CD1, предполагающая использование низких доз антигена, вводимых подкожно в область холки, богатую тканеассоциированными лимфоидными кластерами (ТАЛК), и приводящая к формированию более селективной продукции IgE [7, 11]. Такая индукция синтеза IgE, сопровождающаяся небольшой продукцией IgG, наблюдается у больных с различными видами аллергии, что было показано различными исследователями и нами ранее [21, 26, 28]. Разработанная модель, таким образом, является более клинически релевантной. Она же оптимально подходит для изучения

роли ТАЛК, связанных с подкожной жировой тканью, в формировании специфического ответа на аллерген, поступающий через кожные аллергены, что должно иметь место при atopическом дерматите. Несмотря на имеющиеся литературные данные о значении ТАЛК подкожного жира в локальном иммунном ответе [14, 17], ведущая роль ТАЛК в формировании первичной продукции специфического IgE была показана нами лишь недавно [11], а роль в этом процессе разных типов АПК не известна. Клеточный состав (в том числе по типам АПК) в таких структурах может отличаться от состава ТАЛК в жировой ткани брюшной полости. Каждый отдельный тип АПК может играть свою роль при ответе на низкие и высокие дозы антигена. Именно особенный тип АПК, участвующий в презентации низких (но не высоких) доз антигена при подкожном, а не внутрибрюшинном введении мог быть причиной более селективной индукции специфического IgE в нашем случае.

Целью данной работы было определить роль различных субпопуляций АПК в ранней индукции локального переключения В-лимфоцитов на синтез IgE в ТАЛК подкожного жира в условиях введения низких доз антигена.

Материалы и методы

Животные

В опытах использовали мышей линии BALB/c, самок, возраст 8 недель. Животные содержались при 12-часовом цикле день/ночь в конвенционных условиях в виварии 2 недели до начала опыта и в течение всего опыта до забоя. Кормление осуществлялось *ad libitum*. Все манипуляции с животными были произведены согласно протоколу, одобренному комиссией по работе с лабораторными животными ФГБУН ИБХ РАН, № 149.

Иммунизация и провокация аллергеном

В качестве аллергена использовали стандартный антиген овалбумин OVA (Grade V, SigmaAldrich). Антиген разводили физиологическим раствором (ООО «Мосфарм», Россия) до нужной концентрации, после чего вводили подкожно в область холки или внутрибрюшинно (в/б). Введение осуществлялось в объеме 100 мкл, в дозе 100 нг или 10000 нг (10 мкг). Иммунизацию проводили 3 раза в неделю в течение 4 недель (28 дней). Часть мышей выводили из эксперимента на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни, для провокации высокой дозой антигена и последующего получения образцов сывороток и ткани холки. Число животных в группе *n* составляло 5 особей.

Провокация осуществлялась во всех группах введением разрешающей (250 мкг в 200 мкл) в/б с последующим замером температуры тела инфракрасным бесконтактным термометром (модель SEM DT8806S) в течение 60 минут, каждые 15

минут, как в работе [15]. По результатам для каждой мыши было установлено время, соответствующее наибольшему падению температуры (почти всегда 45 минут после введения разрешающей дозы) и рассчитана величина падения температуры на данный срок.

Получение сывороток и первичных клеток из тканей

Образцы крови брались из подглазничного синуса под изофлурановой (Aeran, Baxter) анестезией. Образцы инкубировали 20 минут при +37 °C а затем центрифугировали (600 g) для получения сывороток, которые сохранялись до момента использования при -20 °C.

Для получения образцов для проточной цитометрии мышей забивали методом цервикальной дислокации. Жировая ткань области холки была извлечена и гомогенизирована. Полученную суспензию клеток в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH = 7,2 центрифугировали при скорости 300 g, в течение 7 минут для отделения дебриса и адипоцитов (последние всплывали на поверхность). Осадок ресуспендировали в FACS буфере (ФСБ с добавлением 0,5%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,01% NaN₃), пропускали через клеточный фильтр (Millipore, 80 мкм).

Постановка иммуноферментного анализа

Для постановки иммуноферментного анализа (ИФА) при определении специфических IgE или IgG₁ в лунки 96-луночного планшета (Costar, MaxiSorp) наносили по 50 мкл раствора OVA с концентрацией 20 мкг/мл или 5 мкг/мл соответственно, и оставляли при +4 °C на ночь. После этого и далее между каждой стадией осуществляли отмывку раствором Твин-20 0,05% в ФСБ минимум трехкратно, с использованием автоматического промывателя ПП2-428 («Иммедтех», Москва). Планшеты блокировали раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) концентрации 5% (при определении IgE) или 1% (при определении IgG₁), 1 час при комнатной температуре. Затем наносились сыворотки в различных разведениях и инкубировались при +4 °C на ночь. Для определения специфического IgE добавляли конъюгат анти-мышинных IgE, меченных пероксидазой хрена (ПХ), в разведении 1:1000 (клон 23G3, Abscam, США), для определения специфических IgG₁ — биотинилированные антитела к IgG₁ мыши в разведении 1:5000 (клон RMG1-1, BioLegend, США) на 2 часа при комнатной температуре. В последнем случае в качестве вторичного конъюгата использовали стрептавидин, конъюгированный с ПХ, в разведении 1:7000 (BioLegend), с последующей инкубацией в течение 1 часа. Проявление осуществлялось с использованием субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Блокирование реакции ТМБ и пероксида водорода осуществлялось добавлением 10% H₂SO₄. Оптическую плотность (ОП) про-

дукта реакции определяли на спектрофотометре (Multiscan FC, ThermoScientific) при длине волны 450 нм за вычетом ОП при 620 нм как обусловленной неспецифическим светопоглощением. Титр сыворотки рассчитывался путем экстраполяции титровочной кривой как разведение, при котором ОП становилась равной ОП фона в лунках, куда не были нанесены образцы, плюс три стандартных отклонения.

Проточная цитометрия

Полученные образцы клеток были окрашены антителами к антигенам мыши коммерческой фирмы BioLegend в разведении, рекомендованном производителем. Использовались следующие антитела: антитела к FcεRI, меченные BV510 (клон MAR1); к CD11c, меченные FITC (клон N418); к CD11b, меченные PE (клон M1/70); к CD206, меченные PerCP (клон C068C2); к общим эпитопам I-A/I-E молекул МНСII, меченные APC (клон M5/114.15.2); к B220, меченные APC-Cy7 (клон RA3-6B2). Инкубация с антителами осуществлялась в течение часа при +4 °С. За 15 минут до цитометрии к клеткам был добавлен ядерный краситель DAPI для исключения дедбриса и мертвых клеток. Цитометрия осуществлялась на приборе MACS QuantTitoSorter (Miltenyi Biotech, Германия). При анализе учитывалось не менее 3×10^4 клеток в гейте лимфоцитов в каждом образце. Анализ данных производили в программе FlowJo V10. Общая стратегия гейтинга клеток показана на рисунке 1. Макрофаги определяли как CD11b⁺CD11c⁻ клетки; M2-макрофаги как CD206⁺CD11b⁺CD11c⁻ [29]; дендритные клетки как CD11c⁺; воспалительные дендритные клетки как CD11c⁺FcεRI⁺CD11b⁺ [18, 25]; плазмацитоидные дендритные клетки среди как B220⁺CD11b⁻ среди невоспалительных CD11c⁺; конвенционные дендритные клетки (CD11b^{-/+}) как МНСII⁺ среди CD11c⁺, не относящихся к воспалительным или плазмацитоидным [18, 25].

Статистический анализ

Анализ результатов и их оформление осуществлялось в MS Excel. Статистический анализ достоверности различий между группами осуществлялся с помощью непараметрического теста Манна–Уитни (U test). При этом статистически значимыми принимались различия между сравниваемыми группами при $p < 0,05$. При построении графиков использовали среднее арифметическое значение показателя в группе и отмечали нормированное стандартное отклонение.

Результаты

Производство аллерген-специфических антител у мышей линии BALB/c при иммунизации разными способами

Для определения связи накопления различных АПК и ранней продукции аллерген-специфических антител мышей линии BALB/c иммунизировали низкими дозами антигена по двум

протоколам – подкожно (п/к) в область холки или внутрибрюшинно (в/б), и забивали на разные сроки для взятия образцов. Результаты, представленные на рисунке 2А, подтверждают более раннее и более интенсивное формирование (начиная с 14-х суток) продукции специфического IgE при иммунизации в область холки, что согласуется с нашими предыдущими данными [11], в то время как при в/б иммунизации достоверная продукция специфического IgE появлялась лишь на 28-е сутки. Продукцию специфического IgG₁ при иммунизации в область холки наблюдали одновременно с продукцией IgE. Эти процессы индуцировались на более ранних этапах иммунизации по сравнению с биосинтезом антител при внутрибрюшном введении антигена (рис. 2Б). При в/б иммунизации достоверная продукция IgG₁ происходила с незначительным опережением продукции IgE у тех же мышей, но позже, чем при иммунизации в область холки (рис. 2Б). Результаты измерения величины падения температуры, прямо пропорциональной интенсивности системной анафилактической реакции, указывают на формирование высокоаффинных анафилактогенных антител к аллергену именно у мышей, иммунизированных п/к в область холки, но не в/б (рис. 2В). Данные рисунка 2 продублированы в таблице 1.

Анализ накопления различных субпопуляций тканевых АПК у мышей линии BALB/c на разные сроки при иммунизации разными способами

Поскольку ранее нами было показано, что индукция переключения В-лимфоцитов на синтез IgE антител при иммунизации в область холки происходит на ранних сроках (в первые 3 недели) исключительно в подкожной жировой ткани в месте попадания аллергена (но не в региональных лимфоузлах) [11], при анализе фенотипа АПК в настоящей работе мы решили остановиться на изучении именно тканевых АПК.

Схема стратегии определения основных субпопуляций АПК показана на рисунке 1. Введение низких доз антигена не вызывало накопления воспалительных, плазмацитоидных или CD11b⁻ классических дендритных клеток ни в подкожном жире области холки, ни в интраперитонеальном жире при соответствующих способах иммунизации, напротив, наблюдалось снижение их содержания. Для воспалительных дендритных клеток достоверное снижение содержания наблюдали на 14-е сутки ($p = 0,026$), для плазмацитоидных на 28-е сутки ($p = 0,003$), для CD11b⁻ классических оно наблюдалось также на наиболее поздний срок и было достоверно ($p = 0,018$) лишь для интраперитонеального жира (рис. 3А, Б, Г, и табл. 2). В то же время было отмечено достоверное накопление содержания CD11b⁺ классических дендритных клеток в жировой ткани области холки на 21-е сутки в срав-

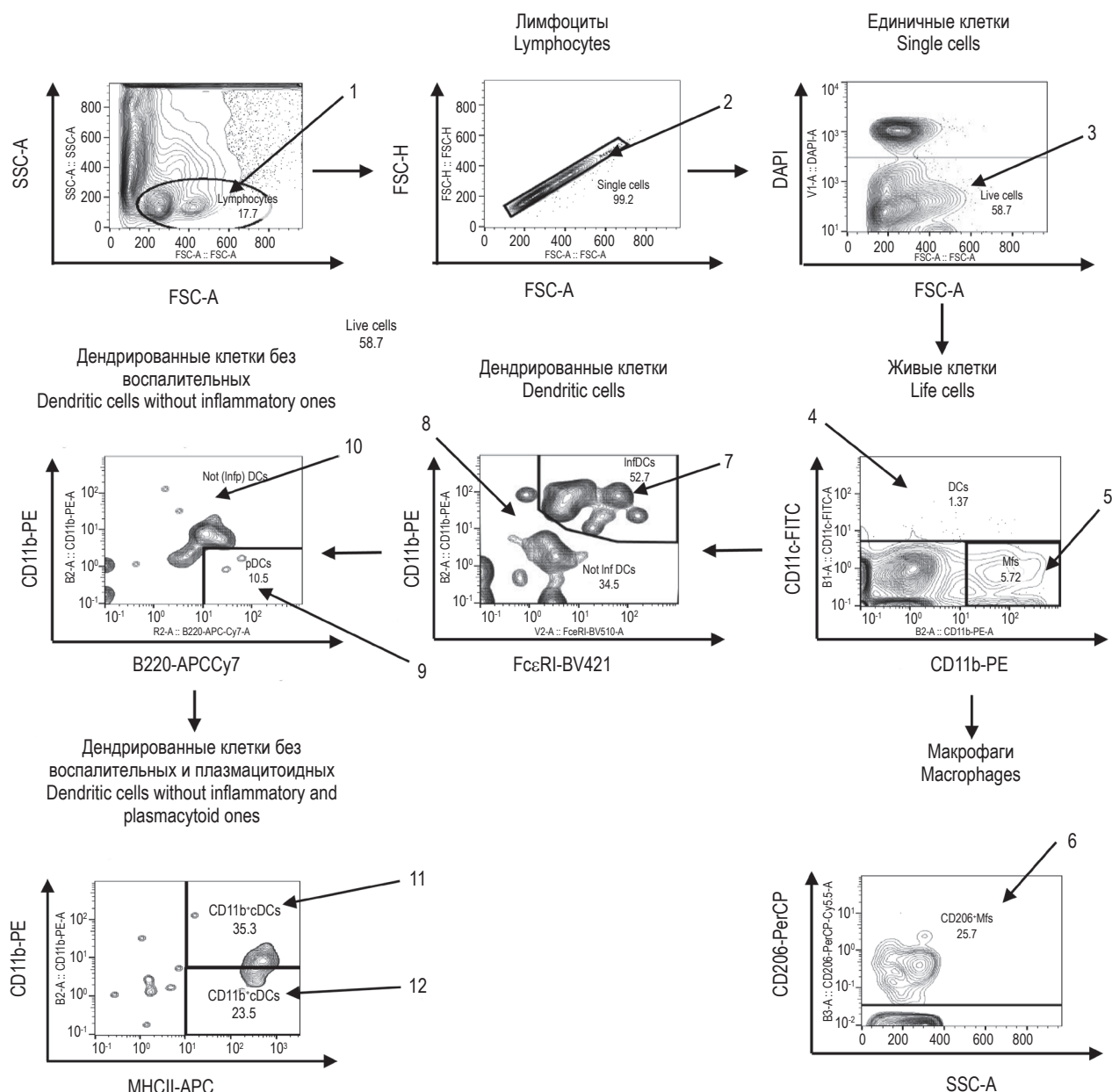


Рисунок 1. Стратегия гейтирования субпопуляций антигенпрезентирующих клеток

Примечание. Курсивом над гистограммами распределения клеток даны подписи субпопуляций, на которые осуществлялся предварительный гейтинг при получении данной гистограммы. Цифрами на гистограммах распределения клеток указаны следующие субпопуляции иммунных клеток: 1 – лимфоциты; 2 – единичные клетки; 3 – живые клетки; 4 – дендритные клетки; 5 – макрофаги; 6 – CD206⁺ макрофаги; 7 – воспалительные дендритные клетки; 8 – дендритные клетки без воспалительных; 9 – плазмацитоидные дендритные клетки; 10 – дендритные клетки без воспалительных и плазмацитоидных; 11 – CD11b⁺ классические дендритные клетки; 12 – CD11b⁻ классические дендритные клетки.

Figure 1. Antigen presenting cells gating strategy

Note. Italics above the histograms of cell distribution are labels of subpopulations, which were pre-gated when obtaining this histogram. Numbers on cell distribution histograms indicate the following subpopulations of immune cells: 1, lymphocytes; 2, single cells; 3, life cells; 4, dendritic cells; 5, macrophages; 6, CD206⁺ macrophages; 7, inflammatory dendritic cells; 8, dendritic cells without inflammatory ones; 9, plasmacytoid dendritic cells; 10, dendritic cells without inflammatory and plasmacytoid ones; 11, CD11b⁺ classical dendritic cells; 12, CD11b⁻ classical dendritic cells.

нении с интактными животными ($p = 0,003$) и недостаточно достоверное на 14-е ($p = 0,053$) (рис. 3В, табл. 2). Напротив, в интраперитонеальном жире, в котором изначальное содержание АПК у интактных мышей выше, чем в подкожном жире, наблюдали тенденции к снижению содержания

CD11b⁺ классических дендритных клеток, достигающие статистической достоверности на поздний (28-е сутки) срок ($p = 0,03$) (рис. 3В, табл. 2). Таким образом, логично предполагать участие именно CD11b⁺ классических дендритных клеток в локальной презентации антигена. Накопле-

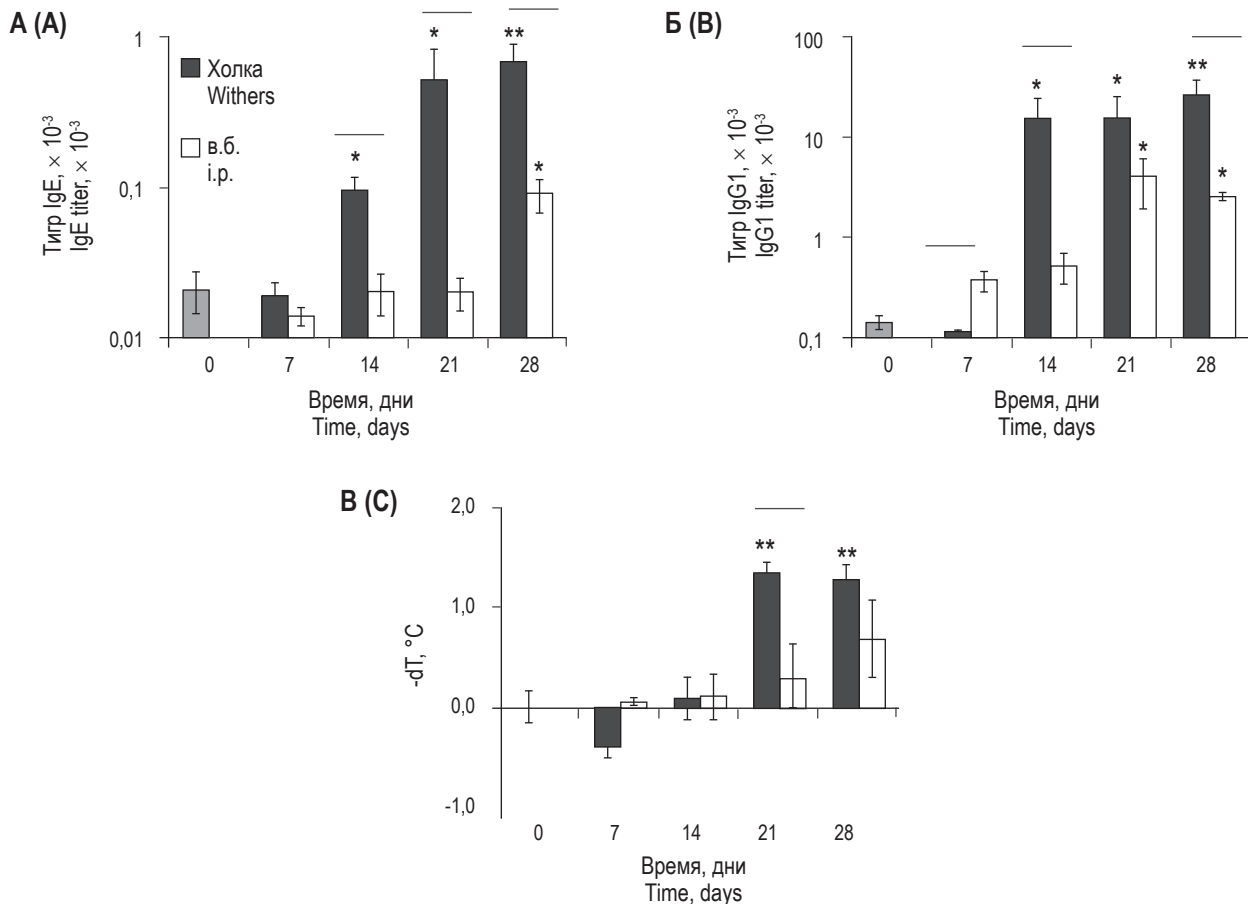


Рисунок 2. Продукция специфических антител и интенсивность системной анафилактической реакции у мышей после длительного введения низких (100 нг) доз антигена

Примечание. Мыши линии BALB/c были иммунизированы 3 раза в неделю в течение 4 недель низкими (100 нг) дозами OVA подкожно в область холки («холка», черные столбики) или внутрибрюшинно («в/б», белые столбики). Продукция специфических антител классов IgE (А) и IgG₁ (Б), а также величина падения температуры через 45 минут после введения разрешающей (250 мкг) дозы антигена (В) на различные сроки протокола иммунизации в сравнении с интактной группой (серые столбики). */** – $p < 0,05/0,01$ в сравнении с интактной группой. Тонкие/толстые планки – $p < 0,05/0,01$ при сравнении групп, иммунизированных в область холки и внутрибрюшинно, на тот же временной срок.

Figure 2. Production of specific antibodies and the intensity of systemic anaphylactic reaction in mice after prolonged administration of low (100 ng) doses of antigen

Note. BALB/c mice were immunized 3 times a week for 4 weeks with low (100 ng) doses of OVA subcutaneously at the withers ("withers", black bars) or intraperitoneally ("i.p.", white bars). Specific IgE (A) or IgG₁ (B) productions, as well as the magnitude of temperature decrease 45 minutes after antigen challenging dose (250 μg) administration (C) at different time points of immunization protocol in comparison with intact group (grey bars). */**, $p < 0.05/0.01$ in comparison with intact group. Thin/thick bars, $p < 0.05/0.01$ between groups immunized by subcutaneous route in withers region and by i.p. route in the same time points.

ние этих АПК в целом совпадало со кинетикой продукции IgE, обусловленной локальным переключением В-лимфоцитов в ткани места попадания аллергена.

Достоверное накопление CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов в подкожной жировой ткани холки наблюдали на 7-е и 21-е сутки после введения низкой дозы антигена ($p = 0,003$ в обоих случаях), при этом на 14-е и 28-е сутки их содержание было также выше, чем в интактной группе, хотя не достоверно ($p = 0,072$ и $p = 0,053$ соответственно) (рис. 4А, табл. 2). В указанные сроки (7-е и 21-е сутки)

наблюдали достоверный подъем содержания не только CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов в целом, но и их субпопуляции, экспрессирующей поверхностный CD206 и относящейся к M2-макрофагам (рис. 4Б, табл. 2). Очевидно приток макрофагов в подкожную жировую ткань осуществлялся двумя «волнами», первая из которых непосредственно предшествовала самому запуску локальной продукции IgE, а вторая – фазе достижения кривой продукции насыщения (из рисунка 1А видно, что достигая максимума на 21-е сутки, продукция специфического IgE у мышей, иммунизирован-

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ И ВЕЛИЧИНА ПАДЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ РАЗРЕШАЮЩЕЙ ДОЗЫ АНТИГЕНА У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ НИЗКОЙ (100 нг) ДОЗОЙ АНТИГЕНА РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ НА РАЗНЫЕ ВРЕМЕННЫЕ СРОКИ

TABLE 1. SPECIFIC ANTIBODY PRODUCTION AND THE MAGNITUDE OF THE FALL IN BODY TEMPERATURE AFTER ADMINISTRATION OF CHALLENGE ANTIGEN DOSE IN MICE IMMUNIZED BY 100 ng OF ANTIGEN BY DIFFERENT ROUTES IN DIFFERENT TIME POINTS

Способ иммунизации Route of immunization	Срок, дни Time, days	Титры IgE, $\times 10^{-3}$ IgE titers, $\times 10^{-3}$	Титры IgG1, $\times 10^{-3}$ IgG1 titers, $\times 10^{-3}$	-dT, °C
Интактные Intact	0	0,021 \pm 0,007	0,14 \pm 0,02	0,0 \pm 0,2
Подкожно, холка Subcutaneous, withers	7	0,019 \pm 0,004 $p_1 = 0,136$ $p_2 = 0,302$	0,112 \pm 0,007 $p_1 = 0,261$ $p_2 = 0,047$	-0,4 \pm 0,1 $p_1 = 0,134$ $p_2 = 0,047$
	14	0,10 \pm 0,02 $p_1 = 0,011$ $p_2 = 0,018$	15 \pm 9 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,018$	0,1 \pm 0,2 $p_1 = 0,323$ $p_2 = 0,149$
	21	0,5 \pm 0,3 $p_1 = 0,014$ $p_2 = 0,030$	15 \pm 10 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,149$	1,4 \pm 0,1 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,024$
	28	0,7 \pm 0,2 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,006$	26 \pm 11 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,006$	1,3 \pm 0,2 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,149$
Интраперитонеально Intraperitoneal	7	0,014 \pm 0,002 $p_1 = 0,291$	0,36 \pm 0,09 $p_1 = 0,264$	0,1 \pm 0,1 $p_1 = 0,117$
	14	0,020 \pm 0,006 $p_1 = 0,5$	0,51 \pm 0,17 $p_1 = 0,264$	0,1 \pm 0,2 $p_1 = 0,206$
	21	0,020 \pm 0,005 $p_1 = 0,429$	4 \pm 2 $p_1 = 0,047$	0,3 \pm 0,3 $p_1 = 0,206$
	28	0,09 \pm 0,02 $p_1 = 0,014$	2,5 \pm 0,2 $p_1 = 0,011$	0,7 \pm 0,4 $p_1 = 0,072$

Примечание. В таблице указаны средние значения и стандартные отклонения. p_1 – достоверность вероятности нулевой гипотезы при сравнении с интактной группой; p_2 – достоверность вероятности нулевой гипотезы при сравнении с интраперитонеально иммунизированными животными на том же сроке иммунизации.

Note. The table shows the means and standard deviations. p_1 , the probability of the null hypothesis when compared with the intact group; p_2 , reliability of the probability of the null hypothesis when compared with intraperitoneally immunized animals at the same time of immunization.

ных в холку, далее не увеличивается). Несмотря то, что у интактных мышей в интраперитонеальном жире содержание CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов было существенно выше, чем в подкожном, при внутрибрюшинной иммунизации не наблюдали изменения их содержания, хотя на 28-е сутки доля CD206⁺CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов возрасла ($p = 0,03$) (рис. 4, табл. 2). Увеличение содержания этих клеток совпадало по времени с запуском продукции IgE у животных при в/б иммунизации.

Продукция антител и накопление тканевых АПК у мышей линии BALB/с, иммунизированных в область холки низкой и высокой дозами антигена

Изучение механизмов формирования аллергического иммунного ответа будет неполным, если не ответить на вопрос, что отличает иммунный

ответ на низкие дозы антигена, стимулирующие продукцию IgE при минимальной продукции IgG₁, от типичного иммунного ответа, формируемого при введении высоких доз антигена. Поэтому в данной работе было также проведено сравнение содержания дендритных клеток в подкожном жире у животных, иммунизированных в область холки низкой (100 нг) и высокой (10 мкг) дозой антигена. Поскольку накопление выше-названных типов АПК наблюдали в основном на 7-е и 21-е сутки, мы сфокусировались именно на этих временных точках.

Результаты, представленные на рисунке 5А, Б и в таблице 3, показывают достоверную продукцию специфического IgE к 21-м суткам только в низкодозовой группе и достоверно более высокую продукцию IgG₁ в высокодозовой группе.

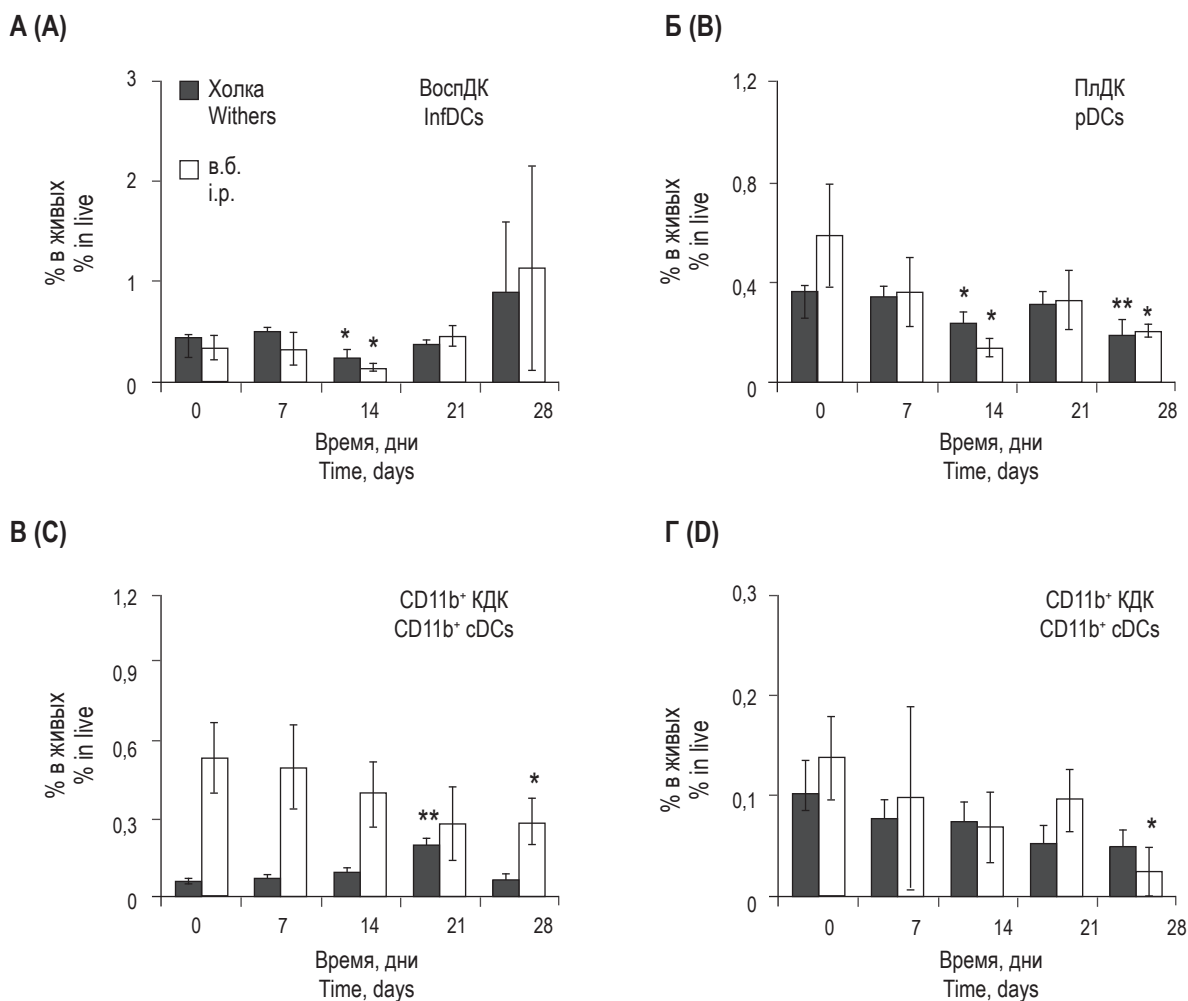


Рисунок 3. Содержание различных субпопуляций дендритных клеток в подкожном жире области холки или интраперитонеальном жире у иммунных мышей

Примечание. Мыши линии BALB/c были иммунизированы 3 раза в неделю в течение 4 недель низкими (100 нг) дозами OVA подкожно в область холки или интраперитонеально. Содержание (% от всех живых единичных клеток в лимфоцитарном гейте) воспалительных (ВоспДК) (А), плазмацитоидных (ПлДК) (Б), CD11b⁺ классических (CD11b⁺ КДК) (В) и CD11b⁻ классических (CD11b⁻ КДК) (Г) дендритных клеток в ткани подкожного жира области холки у мышей, иммунизированных подкожно в область холки («холка», черные столбики), и в ткани интраперитонеального жира у мышей, иммунизированных интраперитонеально («в/б», белые столбики) на разные сроки иммунизации. */** – $p < 0,05/0,01$ в сравнении с интактной группой.

Figure 3. Content of various subpopulations of dendritic cells in the subcutaneous fat of the withers or intraperitoneal fat in immune mice

Note. BALB/c mice were immunized 3 times a week for 4 weeks with low (100 ng) doses of OVA subcutaneously in the withers or intraperitoneally. Content (% of all life cells in lymphocyte gate) of inflammatory (InfDCs) (A), plasmacytoid (pDCs) (B), CD11b⁺ classical (CD11b⁺ cDCs) (C) or CD11b⁻ classical (CD11b⁻ cDCs) (D) in subcutaneous adipose tissue in mice, immunized by subcutaneous route in withers region (“withers”, black bars) or in intraperitoneal fat in mice immunized by i.p. route (“i.p.”, white bars) in different time points. */**, $p < 0.05/0.01$ in comparison with intact group.

Эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее.

На 7-е сутки, непосредственно перед началом продукции специфического IgE, содержание макрофагов в целом, воспалительных, плазмацитоидных и CD11b⁻ классических дендритных клеток в подкожном жире области холки не различалось у мышей, иммунизированных разными дозами антигена (рис. 5В, Г, Е, Ж, табл. 4). В то же время

содержание CD11b⁺ классических дендритных клеток было достоверно выше у мышей, иммунизированных высокой дозой антигена, а содержание CD206⁺ макрофагов было ниже (рис. 5Д, 3, табл. 4). Поскольку продукция IgE формируется быстрее при иммунизации низкими дозами антигена, участие M2-макрофагов индукции специфического гуморального ответа на низкие дозы может быть, таким образом, более суще-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ (В % ОТ ВСЕХ ЖИВЫХ КЛЕТОК) В ПОДКОЖНОМ ЖИРЕ ОБЛАСТИ ХОЛКИ И В ЖИРОВОЙ ТКАНИ БРЮШИНЫ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК – ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ (ВоспДК), ПЛАЗМАЦИТОИДНЫХ (ПлДК), CD11b⁺ И CD11b⁻ КЛАССИЧЕСКИХ ДЕНДРИТНЫХ (КДК), МАКРОФАГОВ (МФ) В ЦЕЛОМ И CD206⁺ M2-МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ НИЗКИМИ ДОЗАМИ АНТИГЕНА, СООТВЕТСТВЕННО, ПОДКОЖНО В ОБЛАСТЬ ХОЛКИ ИЛИ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНО

TABLE 2. % OF DIFFERENT ANTIGEN-PRESENTING CELLS SUBPOPULATIONS – INFLAMMATORY (InfDCs), PLASMACYTOID (pDCs), CD11b⁺ AND CD11b⁻ CLASSICAL DENDRITIC CELLS (CDCs), MACROPHAGES (MφS) AND CD206⁺ M2 MACROPHAGES IN ALL LIFE CELLS IN SUBCUTANEOUS WITHERS ADIPOSE TISSUE OR INTRAPERITONEAL ADIPOSE TISSUE IN MICE AFTER IMMUNIZATION BY LOW ANTIGEN DOSES SUBCUTANEOUSLY IN WITHERS OR BY INTRAPERITONEAL ROUTE

Способ иммунизации, жировая ткань Immunization route, adipose tissue	Срок, дни Time, days	ВоспДК, % InfDCs	ПлДК, % pDCs	CD11b ⁺ КДК, % CD11b ⁺ cDCs	CD11b ⁻ КДК, % CD11b ⁻ cDCs	МФ, %	CD206 ⁺ МФ, %
Интактные, жир области холки Intact, withers adipose tissue	0	0,43±0,05	0,36±0,03	0,07±0,02	0,10±0,03	1,15±0,19	0,25±0,04
Подкожно, холка, жировая ткань области холки Subcutaneous, withers adipose tissue	7	0,51±0,05 p ₁ = 0,072	0,34±0,05 p ₁ = 0,374	0,07±0,02 p ₁ = 0,5	0,08±0,02 p ₁ = 0,284	4±2 p ₁ = 0,003	0,4±0,1 p ₁ = 0,011
	14	0,25±0,07 p ₁ = 0,026	0,24±0,05 p ₁ = 0,017	0,10±0,02 p ₁ = 0,053	0,08±0,02 p ₁ = 0,312	1,9±0,7 p ₁ = 0,072	0,35±0,18 p ₁ = 0,5
	21	0,37±0,05 p ₁ = 0,209	0,31±0,05 p ₁ = 0,096	0,20±0,03 p ₁ = 0,003	0,05±0,02 p ₁ = 0,127	6,0±1,0 p ₁ = 0,003	0,92±0,17 p ₁ = 0,003
	28	0,9±0,7 p ₁ = 0,312	0,19±0,06 p ₁ = 0,003	0,07±0,03 p ₁ = 0,312	0,05±0,02 p ₁ = 0,166	2,2±1,1 p ₁ = 0,053	0,6±0,3 p ₁ = 0,053
Интактные, интраперитонеальный жир Intact, Intra-peritoneal fat	0	0,35±0,12	0,6±0,2	0,53±0,13	0,14±0,04	12±3	1,2±0,5
Интраперитонеально, интраперитонеальный жир Intra-peritoneal, intra-peritoneal fat	7	0,33±0,17 p ₁ = 0,053	0,36±0,14 p ₁ = 0,200	0,50±0,15 p ₁ = 0,337	0,10±0,09 p ₁ = 0,106	11±6 p ₁ = 0,417	1,4±0,8 p ₁ = 0,500
	14	0,15±0,03 p ₁ = 0,003	0,15±0,04 p ₁ = 0,011	0,40±0,13 p ₁ = 0,106	0,07±0,03 p ₁ = 0,106	16±4 p ₁ = 0,264	1,3±0,2 p ₁ = 0,149
	21	0,46±0,10 p ₁ = 0,312	0,33±0,12 p ₁ = 0,106	0,29±0,14 p ₁ = 0,149	0,10±0,03 p ₁ = 0,072	7±4 p ₁ = 0,072	2,0±1,0 p ₁ = 0,337
	28	1,1±1,0 p ₁ = 0,312	0,21±0,03 p ₁ = 0,018	0,29±0,09 p ₁ = 0,03	0,02±0,02 p ₁ = 0,018	15±3 p ₁ = 0,264	2,5±0,3 p ₁ = 0,030

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for table 1.

ственным, чем CD11b⁺ классических дендритных клеток. Это подтверждается тем, что содержание как макрофагов в целом, так и M2 CD206⁺ макрофагов было достоверно выше в подкожном жире у мышей, иммунизированных низкими дозами в сравнении с высокодозовой группой, и на 21-е сутки, в срок, когда кинетическая зависимость титров IgE-достигала плато (рис. 2А, 5Ж, 3, табл. 4).

Кроме того, хотя содержание воспалительных дендритных клеток у мышей, иммунизированных низкой дозой антигена, не повышалось в сравнении с интактной группой, но на 21-е сутки оно было также достоверно выше, чем в высокодозовой группе (рис. 5В, табл. 4). В случае CD11b⁻ классических дендритных клеток тенденции были обратные (рис. 5Е, табл. 4). Содержание CD11b⁺ классических и плазмацитоидных

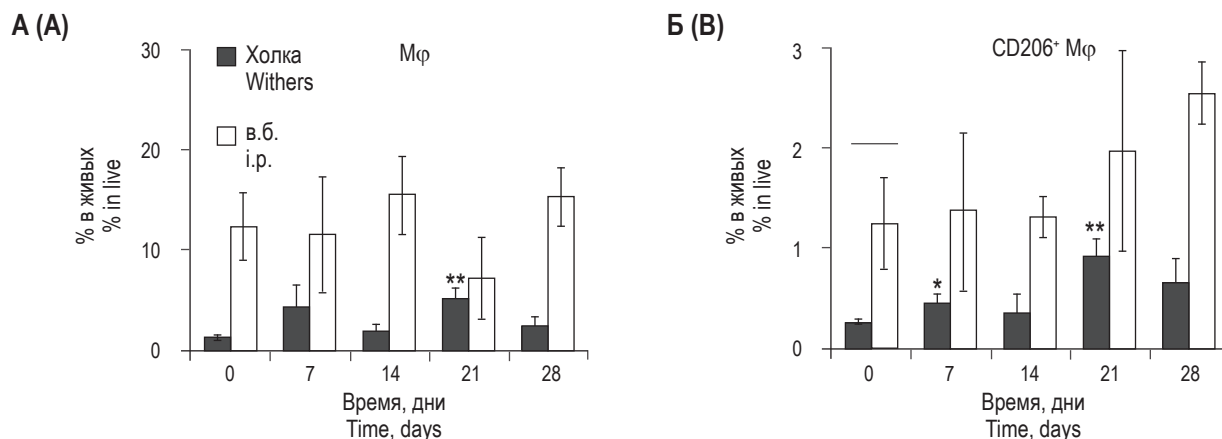


Рисунок 4. Содержание макрофагов в целом и M2-макрофагов в подкожном жире области холки или интраперитонеальном жире у иммунных мышей

Примечание. Мыши линии BALB/c были иммунизированы 3 раза в неделю в течение 4 недель низкими (100 нг) дозами OVA подкожно в область холки или внутривбрюшинно. Содержание (% от всех живых единичных клеток в лимфоцитарном гейте) макрофагов (Mφ) в целом (А) и CD206⁺ макрофагов M2-фенотипа (CD206⁺ Mφ) (Б) в ткани подкожного жира области холки у мышей, иммунизированных подкожно в область холки («холка», черные столбики), и в ткани интраперитонеального жира у мышей, иммунизированных интраперитонеально («в/б», белые столбики) на разные сроки иммунизации. */** – p < 0,05/0,01 в сравнении с интактной группой.

Figure 4. Content of all macrophages and M2 macrophages in subcutaneous withers adipose tissue or in intraperitoneal fat tissue in immune mice

Note. BALB/c mice were immunized 3 times a week for 4 weeks with low (100 ng) doses of OVA subcutaneously in the withers or intraperitoneally. Content (% of all live cells in lymphocyte gate) of all macrophages (Mφ) (A) or M2 macrophages (CD206⁺ Mφ) (B) in subcutaneous adipose tissue in withers region tissue in mice, immunized by subcutaneous route in withers region ("withers", black bars) or in intraperitoneal fat in mice immunized by i.p. route ("i.p.", white bars) in different time points. */**, p < 0.05/0.01 in comparison with intact group.

ТАБЛИЦА 3. ПРОДУКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ НИЗКОЙ (100 нг) ИЛИ ВЫСОКОЙ (10 мкг) ДОЗОЙ АНТИГЕНА ПОДКОЖНО В ОБЛАСТЬ ХОЛКИ НА РАЗНЫЕ ВРЕМЕННЫЕ СРОКИ

TABLE 3. SPECIFIC ANTIBODY PRODUCTION IN MICE AFTER IMMUNIZATION BY LOW (100 ng) AND HIGH (10 μg) ANTIGEN DOSES SUBCUTANEOUSLY IN WITHERS REGION IN DIFFERENT TIME POINTS

Доза антигена Antigen doses	Срок, дни Time, days	Титры IgE, × 10 ⁻³ IgE titers, × 10 ⁻³	Титры IgG1, × 10 ⁻³ IgG1 titers, × 10 ⁻³
Интактные Intact	0	0,020±0,009	0,11±0,03
100 нг 100 ng	7	0,020±0,005 p ₁ = 0,464 p ₂ = 0,264	0,110±0,005 p ₁ = 0,323 p ₂ = 0,200
	21	0,6±0,3 p ₁ = 0,022 p ₂ = 0,072	13±10 p ₁ = 0,004 p ₂ = 0,006
10 мкг (10000 нг) 10 μg (10000 ng)	7	0,014±0,002 p ₁ = 0,464	1,4±0,7 p ₁ = 0,061
	21	0,10±0,04 p ₁ = 0,085	800±300 p ₁ = 0,004

Примечание. В таблице указаны средние значения и стандартные отклонения. p₁ – достоверность вероятности нулевой гипотезы при сравнении с интактной группой; p₂ – достоверность вероятности нулевой гипотезы при сравнении с животными, иммунизированными высокой дозой, на том же сроке иммунизации.

Note. The table shows the means and standard deviations. p₁, the probability of the null hypothesis when compared with the intact group; p₂, reliability of the probability of the null hypothesis when compared with high dose immunized animals at the same time of immunization.

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ (В % ОТ ВСЕХ ЖИВЫХ КЛЕТОК) В ПОДКОЖНОМ ЖИРЕ ОБЛАСТИ ХОЛКИ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК – ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ (ВоспДК), ПЛАЗМАЦИТОИДНЫХ (ПлДК), CD11b⁺ И CD11b⁻ КЛАССИЧЕСКИХ (КДК), МАКРОФАГОВ (МФ) В ЦЕЛОМ И CD206⁺ М2-МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ НИЗКИМИ (100 нг) ИЛИ ВЫСОКИМИ (10 мкг) ДОЗАМИ АНТИГЕНА ПОДКОЖНО В ОБЛАСТЬ ХОЛКИ НА РАЗНЫЕ СРОКИ

TABLE 4. % OF DIFFERENT ANTIGEN-PRESENTING CELLS SUBPOPULATIONS – INFLAMMATORY (InfDCs), PLASMACYTOID (pDCs), CD11b⁺ AND CD11b⁻ CLASSICAL DENDRITIC CELLS (cDCs), MACROPHAGES (Mφs) AND CD206⁺ M2 MACROPHAGES IN ALL LIFE CELLS IN SUBCUTANEOUS WITHERS ADIPOSE TISSUE IN MICE AFTER IMMUNIZATION BY LOW OR HIGH ANTIGEN DOSES SUBCUTANEOUSLY IN WITHERS OR BY INTRAPERITONEAL ROUTE

Доза антигена Antigen dose	Срок, дни Time, days	ВоспДК, % InfDCs, %	ПлДК, % pDCs, %	CD11b ⁺ КДК, % CD11b ⁺ cDCs, %	CD11b ⁻ КДК, % CD11b ⁻ cDCs, %	Мφ, %	CD206 ⁺ Мφ
Интактные Intact	0	0,40±0,05	0,38±0,04	0,07±0,03	0,10±0,04	1,23±0,18	0,25±0,04
100 нг 100 ng	7	0,49±0,04 p ₁ = 0,053 p ₂ = 0,378	0,34±0,04 p ₁ = 0,209 p ₂ = 0,500	0,07±0,02 p ₁ = 0,436 p ₂ = 0,011	0,07±0,02 p ₁ = 0,166 p ₂ = 0,417	4±2 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,149	0,41±0,09 p ₁ = 0,017 p ₂ = 0,011
	21	0,35±0,04 p ₁ = 0,258 p ₂ = 0,018	0,32±0,04 p ₁ = 0,127 p ₂ = 0,417	0,21±0,02 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,200	0,05±0,02 p ₁ = 0,209 p ₂ = 0,018	5,0±0,8 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,006	0,91±0,15 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,047
10000 нг 10000 ng	7	0,50±0,05 p ₁ = 0,072	0,28±0,10 p ₁ = 0,097	0,12±0,02 p ₁ = 0,017	0,03±0,02 p ₁ = 0,017	5,5±1,8 p ₁ = 0,003	0,28±0,09 p ₁ = 0,500
	21	0,13±0,06 p ₁ = 0,005	0,27±0,06 p ₁ = 0,036	0,10±0,03 p ₁ = 0,084	0,18±0,05 p ₁ = 0,127	0,70±0,11 p ₁ = 0,053	0,32±0,03 p ₁ = 0,053

Примечание. См. примечание к таблице 3.

Note. As for Table 3.

дендритных клеток достоверно не различалось (рис. 5Г, Д, табл. 4).

Обсуждение

Вопрос о роли различных типов АПК в презентации антигена, активации Т-клеток и продукции антител на ранних стадиях формирования IgE-зависимых патологий активно изучался [1, 2, 4, 5, 9, 13, 16, 23]. Однако специфика данных процессов в условиях введения низких доз антигена, индуцирующих более селективное формирование продукции IgE, а также в условиях попадания аллергена через подкожную жировую клетчатку, содержащую ТАЛК, оставалась малоизученной. В данной работе методом многоканальной проточной цитометрии был проведен анализ содержания различных субпопуляций АПК в жировой ткани в месте попадания антигена и был сделан первый важный шаг к пониманию данных процессов.

Согласно имеющимся литературным данным, в траффике антигена при его попадании за барьер участвуют в основном CD11b⁺ классические дендритные клетки и в меньшей мере воспалительные дендритные клетки [23]. CD11b⁻ классических плазмацитоидных дендритных клеток предпо-

ложительно тормозят аллергический иммунный ответ [18, 25]. Имеются данные о важной роли макрофагов в модулировании реакции иммунной системы на аллерген/антиген [3, 16], а в ряде работ утверждается способность В-лимфоцитов осуществлять процессинг антигена [13] и даже его транспорт на ранних стадиях и независимо от прочих АПК [27].

Данные о накоплении CD11b⁺ классических дендритных клеток преимущественно в жировой ткани области холки при низкодозовой иммунизации, сопровождающейся формированием проанафилактических IgE антител, совпадают с общепринятой точкой зрения о ведущей роли данных клеток в траффике и презентации попадающих за барьер белков-аллергенов [12, 23, 25]. В то же время важным фактором может являться не только абсолютное количество таких АПК, а соотношение CD11b⁺ и CD11b⁻ классических дендритных клеток, активирующих разные типы иммунного ответа. Действительно, хотя в интраперитонеальной жировой ткани появление небольшой поздней продукции специфических IgE совпадало с достоверным снижением содержания обоих субпопуляций классических дендритных клеток, доля CD11b⁺ классических снижалась лишь вдвое, в то время как доля CD11b⁻ – в пять раз (рис. 3).

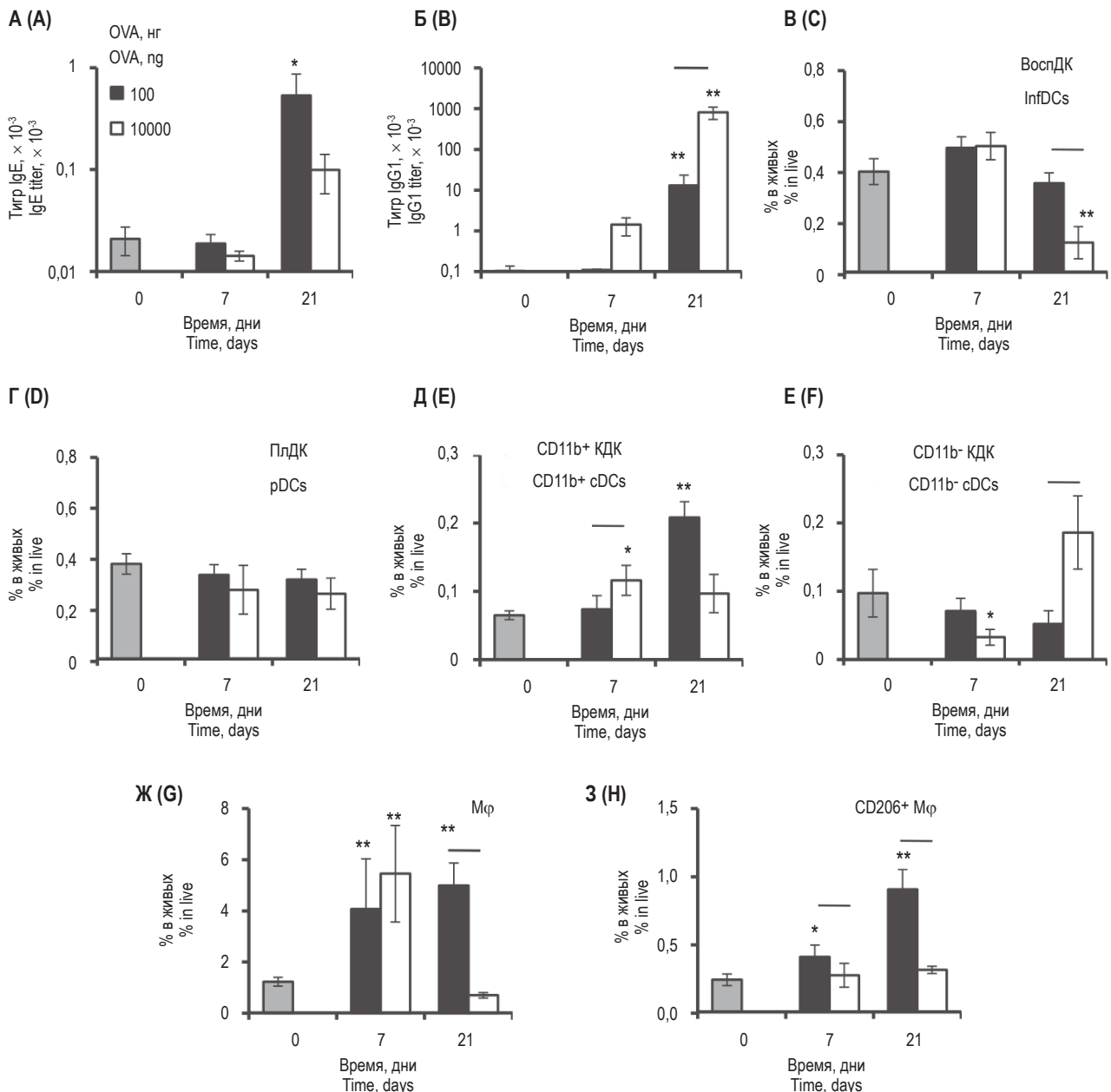


Рисунок 5. Продукция антител и содержание антигенпрезентирующих клеток в подкожном жире области холки у мышей, иммунизированных низкими и высокими дозами антигена

Примечание. Мыши линии BALB/c были иммунизированы 3 раза в неделю низкими (100 нг, черные столбики) или высокими (10000 нг, белые столбики) дозами OVA подкожно в область холки. Продукция специфических IgE (А) и IgG₁ (Б) после 7-го и 21-го дня иммунизации в сравнении с интактной группой (серые столбики), а также содержание (% от всех живых единичных клеток в лимфоцитарном гейте) воспалительных (ВоспДК) (В), плазмацитоидных (ПлДК) (Г), CD11b⁺ классических (CD11b⁺ КДК) (Д) и CD11b⁻ классических (CD11b⁻ КДК) (Е) дендритных клеток, макрофагов в целом (Мф) (Ж) и CD206⁺ макрофагов M2-фенотипа (CD206⁺ Мф) (З) в ткани подкожного жира области холки у мышей на разные сроки иммунизации. */** – $p < 0,05/0,01$ в сравнении с интактной группой. Тонкие / толстые планки – $p < 0,05/0,01$ при сравнении групп, иммунизированных низкой и высокой дозами OVA на один и тот же срок.

Figure 5. Antibody production and content of antigen-presenting cells in the subcutaneous fat of the withers in mice immunized with low and high doses of antigen

Note. BALB/c mice were immunized 3 times a week by low (100 ng, black bars) or high (10000 ng, white bars) OVA doses subcutaneous in withers. Specific IgE (A) and IgG₁ (B) antibody production after 7th and 21th day of immunization in comparison with intact group (grey bars) as well as content (% of all life single cells in lymphocyte gate) of inflammatory (InfDCs) (C), plasmacytoid (pDCs) (D), CD11b⁺ classical (CD11b⁺ cDCs) (E) or CD11b⁻ classical (CD11b⁻ cDCs) dendritic cells (F), macrophages (Mφ) (G) and CD206⁺ M2 macrophages (CD206⁺ Mφ) (H) in subcutaneous adipose tissue in different time points. */**, $p < 0.05/0.01$ in comparison with intact group. Thin / thick bars, $p < 0.05/0.01$ between groups immunized by low and high antigen doses in the same time points.

Хотя принято считать, что макрофаги хуже, чем дендритные клетки, проявляют себя в качестве первичных АПК, они могут служить источниками провоспалительных цитокинов [2, 3, 10] либо, напротив, в случае М2-субпопуляции, секретировать ферменты, отвечающие за ремоделирование внеклеточного матрикса, облегчая миграцию иммунных клеток в ткани, и в то же время противовоспалительные цитокины, блокирующие развитие Т-хелперов [10]. В одной из работ было показано, что такие макрофаги в большей степени ингибируют формирование Th1, чем Th2 [22]. Таким образом, М2-макрофаги в некоторых случаях являются индикаторами локальной поляризации иммунного ответа в сторону 2-го типа и способствуют его поддержанию. В нашем случае данная точка зрения находит подтверждение в том, что рост содержания не только макрофагов в целом, но и CD206⁺ М2-макрофагов в частности, отмеченный на 7-е сутки протокола, предшествовал моменту возникновения первой продукции IgE. На более поздних сроках высокое содержание макрофагов в целом и М2-макрофагов в частности наблюдалось именно у мышей, иммунизированных низкими, но не высокими, дозами антигена. В то же время накопление CD11b⁺ классических дендритных клеток при введении высоких доз антигена наблюдали даже раньше, чем при введении низких доз (рис. 4, 5).

Таким образом, в формировании и поддержании специфического профиля гуморального иммунного ответа на низкие дозы антигена в области, богатой ТАЛК, именно макрофаги могут играть существенную роль. Поскольку макрофаги в качестве первичных АПК работают менее эффективно, чем дендритные клетки [20], надо полагать, что основные этапы презентации антигена в нашей модельной системе происходят с участием CD11b⁺ классических дендритных клеток. Роль макрофагов в нашей модели аллергии может заключаться в опосредованном влиянии на процесс презентации антигена, в создании благоприятного «цитокинового» фона для формирования локальной продукции специфического IgE. Поскольку макрофаги несут на своей поверхности Fc-рецепторы [10, 20], несмотря на их более слабую активность в качестве клеток, процессирующих антиген, они могли транспортировать его из места попадания в близлежащие ТАЛК, содержащие В-лимфоциты, на своей поверхности в составе иммунных комплексов, и работать как «депо» для поступающего в низких дозах антигена. Последнее предположение менее вероятно, поскольку в данном случае большую бы роль играло общее содержание макрофагов в ткани, а не сама их активация с последующим накоплением в сайте воспаления под действием факторов воспаления (аларминов, цитокинов и хемокинов), и поскольку

ку содержание макрофагов у интактных мышей было больше в интраперитонеальном жире, чем в подкожном, то именно интраперитонеальное введение антигена должно было бы индуцировать более интенсивный IgE-ответ.

В дальнейшем планируется изучение факторов, обуславливающих приток моноцитов/макрофагов в сайты введения антигена, а также определение спектра продуцируемых ими цитокинов.

Заключение

В настоящей работе исследования были выполнены на клинически релевантной модели аллергии на лабораторных животных, подразумевающей протокол индукции высокой продукции IgE при минимальной сопутствующей продукции IgG₁, для чего животным в низких дозах вводили антиген подкожно в область холки, богатую ТАЛК, связанными с жировой тканью. Было установлено, что в такой системе наиболее вероятно в качестве первичных АПК могут выступать CD11b⁺ классические дендритные клетки. При этом накопление CD11b⁺CD11c⁻ макрофагов, в том числе их CD206⁺ субпопуляции (М2-макрофаги) также является специфической чертой формируемого при этом локального иммунного ответа.

Благодарности

Авторы выражают благодарность к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН Свирщевой Е.В. за помощь в организации процесса экспериментальной работы, а также м.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий Вавиловой Ю.Д. за помощь в настройке проточного цитометра.

Информация о вкладе авторов и иных лиц

Чудаков Д.Б. — планирование эксперимента; получение финансирования; взятие материала от животных; постановка иммуно-ферментного анализа; постановка проточной цитометрии; обработка результатов; написание рукописи.

Коновалова М.В. — содержание животных; иммунизация животных.

Коцарева О.Д. — постановка иммуноферментного анализа.

Шевченко М.А. — статистическая обработка данных.

Стрельцова М.А. — помощь в постановке проточной цитометрии, первичная настройка прибора.

Сергеев А.А. — помощь в обработке данных, оформление иллюстраций и таблиц.

Фаттахова Г.В. — окончательный анализ данных; редактирование рукописи, подготовка окончательного варианта рукописи.

Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи до публикации.

Список литературы / References

1. Балаболкин И.И., Булгакова В.А., Елисеева Т.И. Современный взгляд на развитие и подходы к терапии атопического дерматита у детей // Фарматека, 2020. Т. 27, № 1. С. 20-27. [Balabolkin I.I., Bulgakova V.A., Eliseeva T.I. A modern view on the development and approaches to the treatment of atopic dermatitis in children. *Farmateka = Pharmateka*, 2020, Vol. 27, no. 1, pp. 20-27. (In Russ.)]
2. Губернаторова Е.О., Намаканова О.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Клеточные источники ИЛ-6 в патогенезе острой аллергической астмы // Аллергология и иммунология, 2018. Т. 19, № 2. С. 115. [Gubernatorova E.O., Namakanova O.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Cellular sources of IL-6 in the pathogenesis of acute allergic asthma. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2018, Vol. 19, no. 2, p. 115. (In Russ.)]
3. Елисютина О.Г., Феденко Е.С., Болдырева М.Н., Гудима Г.О. Особенности иммунного ответа и роль некоторых цитокинов при атопическом дерматите // Российский аллергологический журнал, 2015. № 1. С. 3-14. [Elisyutina O.G., Fedenko E.S., Boldyreva M.N., Gudima G.O. Features of the immune response and the role of some cytokines in atopic dermatitis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2015, Vol. 1, pp 3-14. (In Russ.)]
4. Кайбышева В.О., Михалева Л.М., Никонов Е.Л., Шаповальянц С.Г. Эпидемиология, этиология и патогенез эозинофильного эзофагита. Новейшие данные // Доказательная гастроэнтерология, 2019. Т. 8, № 2. С. 50-72. [Kaibysheva V.O., Mikhalyova L.M., Nikonov E.L., Shapovalyantz S.G. Epidemiology, etiology and pathogenesis of eosinophilic esophagitis. Latest data. *Dokazatelnaya gastroenterologiya = Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*, 2019, Vol. 8, no. 2, pp. 50-72. (In Russ.)]
5. Сидоренко Е.В., Выхристенко Л.Р. Фенотип-ориентированная иммунотерапия бронхиальной астмы // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2018. № 3. С. 60-68. [Sidorenko E.V., Vykhristenko L.R. Phenomenon-oriented immunotherapy for bronchial asthma. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology and Infectology*, 2018, no. 3, pp. 60-68. (In Russ.)]
6. Хаитов М.Р., Гайсина А.Р., Шиловский И.П., Смирнов В.В., Раменская Г.В., Никонова А.А., Хаитов Р.М. Роль интерлейкина 33 в патогенезе бронхиальной астмы. Новые экспериментальные данные // Биохимия, 2018. Т. 83, № 1. С. 19-33. [Khaitov M.R., Gaisina A.R., Shilovsky I.P., Smirnov V.V., Ramenskaya G.V., Nikonova A.A., Khaitov R.M. The role of interleukin 33 in the pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2018, Vol. 83, no. 1, pp. 19-33. (In Russ.)]
7. Чудаков Д.Б., Рязанцев Д.Ю., Каширина Е.И., Бержец В.М., Свирщевская Е.В. Роль дозы аллергена в индукции у мышей IgE антител на белки из клещей домашней пыли // Иммунология, 2014. Т. 35, № 6. С. 321-328. [Chudakov D.B., Rysantsev D.Yu., Kashirina E.I., Berzhets V.M., Svirshevskaya E.V. The role of allergen dose in the induction in mice of IgE antibodies to proteins from house dust mites. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 6, pp. 321-328. (In Russ.)]
8. Alessandrini F., Musiol S., Schneider E., Blanco-Perez M., Albrecht M. Mimicking antigen-driven asthma in rodent models – how close can we get? *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575936. doi: 10.3389/fimmu.2020.575936.
9. Balbo P., Silvestri M., Rossi G.A., Crimi E., Burastero S.E. Differential role of CD80 and CD86 on alveolar macrophages in the presentation of allergen to T lymphocytes in asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 2001, Vol. 31, no. 4, pp. 625-636.
10. Chávez-Galán L., Olleros M.L., Vesin D., Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169⁺ and TCR⁺ Macrophages. *Front Immunol.* 2015, Vol. 6, 263. doi: 10.3389/fimmu.2015.00263.
11. Chudakov D.B., Rysantsev D.Yu., Tsaregorodtseva D.S., Kotsareva O.D., Fattakhova G.V., Svirshevskaya E.V. Tertiary lymphoid structure related B-cell IgE isotype switching and secondary lymphoid organ linked IgE production in mouse allergy model. *BMC Immunol.*, 2020, Vol. 21, 45. doi: 10.1186/s12865-020-00376-7.
12. Constant S.L., Brogdon J.L., Piggott D.A., Herrick C.A., Visintin I., Ruddle N.H., Bottomly K. Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation *in situ*. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, no. 10, pp. 1441-1448.
13. Dullaers M., Schuijs M.J., Willart M., Fierens K., van Moorleghem J., Hammad H., Lambrecht B.N. House dust mite-driven asthma and allergen-specific T cells depend on B cells when the amount of inhaled allergen is limiting. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 140, no. 1, pp. 76-88.
14. Frasca D., Diaz A., Romero M., Thaller S., Blomberg B.B. Secretion of autoimmune antibodies in the human subcutaneous adipose tissue. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 5, e0197472. doi: 10.1371/journal.pone.0197472.
15. Kawakami Y., Sielski R., Kawakami T. Mouse body temperature measurement using infrared thermometer during passive systemic anaphylaxis and food allergy evaluation. *J. Vis. Exp.*, 2018, Vol. 14, 58391. doi: 10.3791/58391.
16. Marichal T., Ohata K., Bedoret D., Mesnil C., Sabatel C., Kobiyama K., Lekeux P., Coban C., Akira S., Ishii K.J., Bureau F., Desmet C.J. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, pp. 996-1002.
17. McDonnell M.E., Ganley-Leal L.M., Mehta A., Bigornia S.J., Mott M., Rehman Q., Farb M.G., Hess D.T., Joseph L., Gokce N., Apovian C.M. B lymphocytes in human subcutaneous adipose crown-like structures. *Obesity (Silver Spring)*, 2012, Vol. 20, no. 7, pp. 1372-1378.

18. Merad M., Sathe P., Helft J., Meller J., Mortha A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 563-604.
19. Morris D.L., Cho K.W., Delproposto J.L., Oatmen K.E., Geletka L.M., Martinez-Santibanez G., Singer K., Lumeng C.N. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4⁺ T cells in mice. *Diabetes*, 2013, Vol. 62, no. 8, pp. 2762-2772.
20. Murphy K.P. *Janeway's immunobiology*. 6th ed. New York: Garland Science, 2011.
21. Niedenberger V., Niggemann B., Kraft D., Spitzauer S., Valenta R. Evolution of IgM, IgE and IgG (1-4) antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms. *Eur. J. Immunol.*, 2002, Vol. 32, no. 2, pp. 576-584.
22. Oishi S., Takano R., Tamura S., Tani S., Iwaizumi M., Hamaya Y., Takagaki K., Nagata T., Seto S., Horii T., Osawa S., Furuta T., Miyajima H., Sugimoto K. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. *Immunology*, 2016, Vol. 149, no. 3, pp. 320-328.
23. Plantinga M., Guilliams M., Vanheerswynghels M., Deswarte K., Branco-Madeira F., Toussaint W., Vanhoutte L., Neyt K., Killeen N., Malissen B., Hammad H., Lambrecht B.N. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 2, pp. 322-335.
24. Poulsen L.K., Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann. Med.*, 2007, Vol. 39, no. 6, pp. 440-456.
25. Schlitzer A., Ginhoux F. Organization of the mouse and human DC network. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, pp. 90-99.

Авторы:

Чудаков Д.Б. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Коновалова М.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Коцарева О.Д. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Шевченко М.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Стрельцова М.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Сергеев А.А. — аспирант лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Фаттахова Г.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Chudakov D.B., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Konovalova M.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kotsareva O.D., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Shevchenko M.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Streltsova M.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Sergeev A.A., Postgraduated Student, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Fattakhova G.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation