

УДК 612.67.017.12:612.112.94

Т. Л. Ехнева

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ У ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

За последние годы накоплены данные, свидетельствующие о том, что изменение антителообразования в старости — процесс неоднозначный. Так, если на первое введение антигена иммунный ответ в старом возрасте снижен [8, 16, 20], то при повторном и последующих воздействиях тем же антигеном он может быть равен и даже превышать ответ в более ранние возрастные периоды [3, 4, 6, 11, 14]. Одно из объяснений указанного факта может быть связано с высоким уровнем формирования иммунологической памяти в старости. Возможно, после первого контакта с антигеном в старом организме, независимо от величины первичного ответа, остается достаточно большое количество клеток памяти. В пользу такого предположения могут свидетельствовать данные о том, что подавление образования антител к гаптену не связано с торможением формирования памяти к нему при введении комплекса гаптен-носитель (динитрофенол-гемоцианин) [17], а клетки памяти при иммунизации бараньими эритроцитами не идентичны с клетками, секретирующими антитела [18], и могут быть отделены от клеток — эффекторов хелперной активности [7].

К выводу о том, что иммунологическая память сохраняется без значительного расстройства в процессе старения, пришли Фингер и Эммерлинг [12, 13] на основании косвенных данных: через 8 мес после примирования 3- и 12-месячных мышей они получили одинаковый вторичный ответ у животных обеих возрастных групп.

Методика исследований

Для изучения клеток памяти была избрана модель воспроизведения вторичного ответа у смертельно облученных реципиентов после переноса им клеток селезенки от примированных сингенных доноров разного возраста. Доноры — мыши линии СВА, самки, двух возрастных групп: молодые зрелые — 3—4 мес и старые — 24—28 мес. Реципиенты — мыши той же линии 3—4 мес возраста. Реципиентов облучали на аппарате РУМ-13 (фильтры: Си — 0,5 и А1 — 1,0) в дозе 850 Р. В день облучения и в последующие дни животные получали питьевую воду с антибиотиками (1,13 г мономицина и 113 мг полимиксина М — сульфата на 1 л воды). Примирование доноров проводилось за 30—40 дней до переноса им клеток реципиентам. Этот срок является оптимальным для развития памяти при введении антигенов различной силы [5]. Антиген — бараньи эритроциты — вводили внутривенно в двух дозах: 5×10^6 и 5×10^8 клеток. Использование двух доз антигена для примирования основывается на данных об обратной зависимости образования иммунологической памяти от силы антигенного воздействия [5, 10], а также на обнаруженном нами факте различной возрастной активности антителообразования при действии антигена различной силы [3].

О клетках памяти у доноров судили по количеству антителообразующих клеток в селезенках реципиентов на шестой, седьмой и восьмой дни после переноса 10^7 ядродержащих клеток селезенки примированных доноров вместе с 5×10^8 эритроцитов барана. Различные сроки исследования связаны с наличием данных об одно-двухдневном отставании пика ответа у старых животных [13].

IgM и IgG антителообразующие клетки (прямые и непрямые бляшкообразующие клетки — ПБОК и НБОК) определяли методом локального гемолиза в геле [9, 15]. Не-

обходимую для выявления непрямых БОК анти-IgG сыворотку готовили посредством двукратной иммунизации кроликов иммуноглобулином G, выделенным на сефадексе G-200 из сыворотки крови мышей: первое введение—4 мг (по белку) препарата с полным адьювантом Фрейнда подкожно, через две—три недели, второе введение—4 мг препарата внутривенно. Сыворотка в разведении 1:50 давала пяти-шестикратное увеличение количества бляшкообразующих клеток. В таком разведении она и употреблялась в опыте. Поскольку анти-IgG сыворотка одновременно с усилением НБОК может тормозить до 25—30% ПБОК [21], для характеристики НБОК приводится общее количество БОК, полученное после действия сыворотки.

Лимфоидные клетки сингенного донора вызывают восстановление лимфоидной системы облученного реципиента, поэтому для характеристики восстанавливающей способности перенесенных клеток селезенки примированного донора определяли селезеночный индекс (отношение веса селезенки к весу тела, умноженное на 100) и общий цитоз в селезенках реципиентов.

Параллельно у отдельной группы животных-доноров через 30—40 сут после примирования определяли количество розеткообразующих клеток — РОК в селезенках. Поскольку РОК — это антигенсвязывающие клетки, к ним должны относиться и клетки памяти у иммунных животных. Сопоставляя количество РОК у доноров с выявленным у интактных животных, можно в какой-то степени судить об относительном количестве клеток памяти у доноров. РОК определяли по [24], с небольшими изменениями (для постановки розеткообразования использовался раствор Хенкса с 0,01% человеческого альбумина).

Статистическая обработка показателей селезеночного индекса и количества кариоцитов в селезенке производилась с помощью непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни [2], а количества РОК и БОК с помощью средних геометрических [1]. В первом случае приводятся медианы и минимальные и максимальные показатели в каждой группе наблюдений, во втором — средние геометрические с указанием ошибки средней.

Каждая группа наблюдений включает данные, полученные при переносе клеток от 10—12 доноров. Клетки от одного донора одновременно переносили двум—трем реципиентам. Полученные показатели усредняли.

Результаты исследований

Перенос клеток селезенки от примированных доноров смертельно облученным реципиентам вызывает у них восстановление лимфоидной системы. Об этом можно судить по величине селезеночного индекса и количеству кариоцитов в селезенках (табл. 1). Из приведенных данных видно, что при восстановлении клетками от молодых доноров селезеночный индекс у реципиентов во все сроки исследования выше, чем при восстановлении клетками от старых животных. Различия в величине селезеночного индекса на протяжении исследуемого периода (шестой, седьмой и восьмой дни) у животных одной и той же группы хотя и не подтверждены статистически, однако максимальные его величины почти во всех случаях отмечаются на седьмой день.

Доза антигена, используемая для примирования доноров, оказывает определенное влияние на величину селезеночного индекса у реципиентов. Этот показатель после переноса клеток от доноров I и II групп выше, чем от доноров III и IV групп. Однако статистически различия доказаны не во всех случаях. Аналогичны и данные общего содержания кариоцитов в селезенке реципиентов (табл. 1).

Итак, клетки от молодых примированных доноров вызывают в селезенках облученных реципиентов более эффективное восстановление лимфоидной ткани (по селезеночному индексу и количеству кариоцитов), чем клетки от старых примированных доноров. Обнаружена также более выраженная восстанавливающая активность клеток, примированных меньшей дозой антигена.

При исследовании антителообразующих клеток в селезенках реципиентов обращают на себя внимание следующие моменты (см. рисунок): 1) количество прямых и непрямых БОК после переноса клеток от молодых доноров выше, чем от старых животных; 2) примирование

Таблица 1
Селезеночный индекс и количество кардиоцитов на селезенку у реципиентов на шестой, седьмой и восьмой дни после переноса им 10^7 клеток селезенки (+ антиген) от молодых и старых доноров, привитых 5×10^6 и 5×10^8 бараньих эритроцитов

Группа	Примиряющая доза эритроцитов барана	Доноры	Селезеночный индекс				Кардиоциты на селезенку ($\times 10^6$)			
			Дни исследования				Дни исследования			
			6	7	8		6	7	8	
I	5×10^6	Молодые	0,32 (0,16—0,84)	0,32 (0,17—0,51)	0,29 (0,20—0,37)		4,4 (1,5—7,0)	6,5 (3,3—13,3)	5,6 (3,0—8,8)	
II		старые P I—II	0,20 (0,13—0,38) =0,05	0,26 (0,15—0,48) <0,05	0,22 (0,16—0,29) ≥0,05		3,1 (1,5—5,4) =0,005	4,4 (2,3—6,6) <0,01	4,1 (2,0—7,0) >0,05	
III	5×10^8	Молодые	0,24 (0,15—0,33)	0,29 (0,12—0,48)	0,27 (0,19—0,45)		4,0 (1,2—20,0)	5,0 (2,3—10,3)	5,5 (3,1—11,6)	
IV		старые P III—IV	0,22 (0,09—0,38) >0,05	0,24 (0,12—0,32) <0,01	0,18 (0,17—0,20) <0,001		3,1 (1,4—20,0) >0,05	3,5 (2,1—5,5) =0,05	2,6 (1,4—2,9) =0,025	

Таблица 2
Селезеночный индекс, количество кардиоцитов и количество РОК на селезенку у интактных мышей и мышей, привитых 5×10^6 или 5×10^8 бараньих эритроцитов, через 30—40 дней после введения антигена

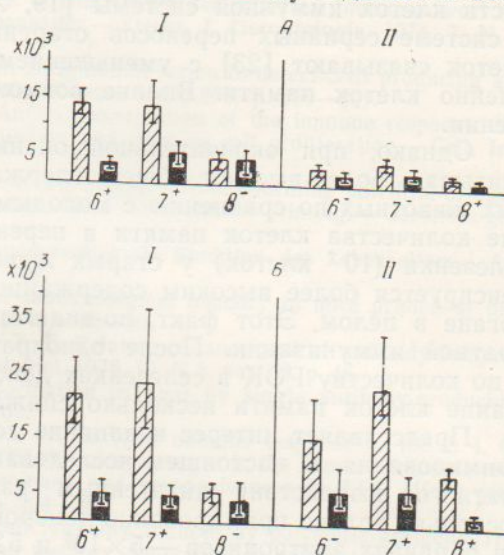
Группа мышей	Селезеночный индекс				Кардиоциты/селезенку ($\times 10^7$)				РОК/селезенку ($\times 10^3$)			
	Селезеночный индекс				Кардиоциты/селезенку ($\times 10^7$)				РОК/селезенку ($\times 10^3$)			
	Молодые	Старые	P ₁		Молодые	Старые	P ₁		Молодые	Старые	P ₁	
Интактные	0,38 (0,31—0,42)	0,47 (0,40—0,74)	<0,01		14,4 (9,0—24,0)	21,6 (13,2—40,0)	<0,01		2,9 (3,3—2,5)	2,0 (2,5—1,6)	>0,05	
Привитые бараньими эритроцитами в дозе 5×10^6	0,38 (0,29—0,52)	0,56 (0,39—1,11)	<0,001		14,0 (8,4—18,9)	20,0 (9,0—35,0)	<0,001		19,2 (23,1—16,0)	9,0 (12,0—6,6)	<0,05	
5×10^8	0,39 (0,34—0,44)	0,59 (0,29—1,29)	<0,001		15,9 (10,0—22,2)	24,5 (16,7—41,6)	<0,005		4,0 (4,7—3,4)	3,1 (3,6—2,7)	>0,05	
P ₂	—	>0,05			—	<0,05			<0,001	<0,01		

Примечание. P₁—достоверность различий между группой старых и молодых животных; P₂—достоверность различий между двумя группами, привитыми разными дозами антигена.

доноров меньшей дозой антигена вызывает достаточно активный ответ и прямых, и не прямых БОК, тогда как примирование значительно большей дозой вызывает в основном ответ не прямых БОК; 3) максимум ответа почти во всех случаях наблюдается на седьмой день: различия, однако, статистически доказаны только между седьмым и вось-

Количество прямых (А) и не прямых (Б) бляшкообразующих клеток (ПБОК и НБОК) на селезенку (по вертикали) у реципиентов на шестой, седьмой и восьмой дни после переноса им 10^7 клеток селезенки (+антиген) от молодых (заштрихованные столбики) и старых (черные столбики) доноров, примированных 5×10^6 (I) и 5×10^8 (II) эритроцитов барана.

По горизонтали — дни исследования. «+» или «-» — наличие или отсутствие достоверности возрастных различий.



мым днями. Итак, и по количеству антителообразующих клеток ответ клеток селезенки от молодых доноров выше, чем от старых животных.

Поскольку по ответу реципиентов судили о наличии клеток памяти только в определенном, переносимом количестве клеток селезенки примированных доноров, для общей характеристики клеток памяти у молодых и старых животных исследовали селезеночный индекс, количество кариоцитов и РОК на всю селезенку у доноров через 30—40 дней после примирования (табл. 2). Из представленного материала видно, что у старых мышей первые два показателя выше, а количество РОК меньше, чем у молодых. Кроме того видно, что примирование меньшей дозой антигена сопровождается наличием большего количества РОК на всю селезенку по сравнению с примированием стократно превышающей дозой антигена.

Обсуждение результатов исследований

Исследование клеток селезенки примированных доноров во втором ответе у реципиентов производилось, как уже указывалось, через 30—40 дней после примирования. По количеству антителообразующих клеток у реципиентов, которым одновременно с клетками селезенки доноров вводили и разрешающую дозу того же антигена, судили об относительном количестве клеток памяти у доноров. Поскольку от молодых и старых доноров переносили реципиентам одинаковое количество кариоцитов селезенки — 10^7 клеток, исходя из полученных данных, можно сделать заключение о том, что в переносимом количестве лимфоидных клеток от старых животных находится меньше клеток памяти к данному антигену. Возможно, однако, что клетки памяти от старых доноров хуже пролиферируют и дифференцируются в антителообразующие клетки в организме реципиентов по сравнению

с клетками от молодых доноров. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что общий цитоз в селезенках облученных реципиентов, восстановленных клетками от старых доноров, также оказывается сниженным (табл. 1). В литературе есть данные о снижении с возрастом пролиферативной и дифференцировочной способности клеток иммунной системы [19, 22, 23]. Причем, обнаруженное в системе серийных переносов старение клона антителообразующих клеток связывают [23] с уменьшением пролиферативной способности именно клеток памяти. Вполне возможно, что верны оба предположения.

Однако, при окончательной оценке полученного факта следует учитывать более высокое общее содержание клеток в селезенках у старых животных по сравнению с молодыми (табл. 2). Возможное снижение количества клеток памяти в переносимом количестве кариоцитов селезенки (10^7 клеток) у старых животных в какой-то степени компенсируется более высоким содержанием лимфоидных клеток во всем органе в целом. Этот факт, по-видимому, имеет значение при многократной иммунизации. После однократного введения антигена, судя и по количеству РОК в селезенках доноров, у старых животных содержание клеток памяти несколько снижено по сравнению с молодыми.

Представляет интерес и влияние дозы антигена, используемой для примирования. В настоящем исследовании определяли результат однократного воздействия антигенным раздражителем различной силы, поскольку только примирование доноров производили различными дозами бараньих эритроцитов — 5×10^6 и 5×10^8 клеток, а вторичный антигенный стимул в организме реципиентов был одинаков в обоих случаях — 5×10^8 . В этих условиях однократного воздействия различными дозами антигена более выраженные возрастные различия получены при использовании меньшей дозы.

Выводы

1. В модели адоптивного переноса клетки селезенки от старых примированных доноров дают меньший вторичный ответ, чем равное количество клеток молодых животных.
2. Общее количество клеток первичной иммунологической памяти (т. е. после первого введения антигена) на всю селезенку у старых животных, по-видимому, несколько снижено, хотя и приближается к наблюдаемому у молодых.
3. Примирование доноров меньшей дозой антигена дает более выраженные возрастные различия во вторичном ответе в культуре *in vivo*.
4. Максимум антителообразования при вторичном ответе в культуре *in vivo* наблюдается на седьмой день после переноса клеток, независимо от возраста доноров переносимых клеток.

Литература

1. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Госмедиздат, 1962. — 180 с.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медикобиологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. — 141 с.
3. Ехнева Т. Л. Особенности выработки антител в онтогенезе. — Материалы IX научной конференции по возрастной морфологии, физиологии, биохимии. Т. 2, ч. I, Москва, 1969, с. 246—247.
4. Ехнева Т. Л. Возрастные особенности иммунного ответа крыс при многократном введении различных доз бараньих эритроцитов. — Бюл. эксперим. биол. и мед., 1976, 81, № 5, с. 572—574.

5. Халатян Н. А., Пинегин Б. В. Кинетика формирования у мышей иммунологической памяти в системе сингенного переноса.—ЖМЭИ, 1973, № 11, с. 67—71.
6. Adler W. H. Aging and immune function.—Bio Science, 1975, 25, N 10, p. 652—657.
7. Araneo B. A., Marrack Ph. C., Kappler J. W. Functional heterogeneity among the T-derived lymphocytes of the mouse. VI. Memory T cells stored in the T₂ subpopulation.—J. Immunol., 1976, 117, N 6, p. 2131—2136.
8. Beneke G., Emmerling P., Finger H. e. a. Die Kinetik der primären Immunantwort bei der Maus in Abhängigkeit vom Lebensalter.—Ztschr. f. Gerontologie, 1974, 7, N 1, S. 12—45.
9. Dresser D. W., Wortis H. H. Use of an antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low haemolytic efficiency.—Nature, 1965, 208, p. 859—861.
10. Feldbush T. L., Van der Hoven A. Antigen modulation of the immune response. IV. Selective triggering of antibody production and memory cell proliferation.—Cell. Immunol., 1976, 25, N 2, p. 152—162.
11. Finger H., Beneke G., Emmerling P. e. a. Secondary antibody-forming potential of aged mice, with special reference to the influence of adjuvant on priming.—Gerontologia, 1972, 18, p. 77—95.
12. Finger H., Emmerling P. Das Immunopotential als Funktion des Lebensalters.—Actuelle Gerontologie, 1973, 3, N 1, S. 5—23.
13. Finger H., Emmerling P. Duration of immunological memory in mice primed at different ages.—Gerontologia, 1973, 19, N 1, p. 22—30.
14. Jaroslow B. N., Suhrbier K. M., Fritz T. E. Relative enhancement of antibody-forming capacity in aging dogs.—The Gerontologist, 1973, 13, N 3, part II, p. 46.
15. Jerne N. K., Nordin A. A., Plaque formation in agar by single antibody-producing cells.—Science, 1963, 140, N 3565, p. 405.
16. Kishimoto S., Takahama T., Mizumachi H. In vitro immune response to the 2, 4, 6-trinitrophenyl determinant in aged C57BL/6J mice: changes in the humoral immune response to avidity for the TNP determinant and responsiveness to LPS effect with aging.—J. Immunol., 1976, 116, N 2, p. 294—300.
17. Klaus G. G. B., Willcox H. N. A. B cell tolerance induced by polymeric antigens. III. Dissociation of antibody formation and memory generation in tolerant mice.—Europ. J. Immunol., 1975, 5, N 10, p. 699—704.
18. L'Age-Stehr J., Herzenberg L. A. Immunological memory in mice. I. Physical separation and partial characterization of memory cells for different immunoglobulin classes from each other and from antibody-produced cells.—J. Exp. Med., 1970, 131, N 6, p. 1093—1108.
19. Makinodan T., Adler W. H. Effect of aging on differentiation and proliferation potentials of cells of the immune system.—Federation Proc., 1975, 34, N 2, p. 153—158.
20. Nordin A., Makinodan T. Humoral immunity in aging.—Federation Proc., 1974, 33, N 9, p. 2033—2035.
21. Rittenberg M. B., Pratt K. L. Antitrinitrophenyl (TNP) plaque assay. Primary response of Balb/c mice to soluble and particulate immunogen.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1969, 132, N 2, p. 575—581.
22. Stoltzner G., Makinodan T. Age-dependent decline in proliferation of lymphocytes.—In: Adv. in Exp. Med., Biol., Explorations in aging., N. Y.—Lond.: Plenum Press, 1975, 61, p. 21—37.
23. Williamson A. R., Askonas B. A. Senescence of antibody-forming cell clone.—Nature, 1972, 238, N 5363, p. 337—339.
24. Wilson J. D. The functions of immune T and B rosette-forming cells.—Immunology, 1973, 25, p. 185—196.

Институт геронтологии АМН СССР, Киев

Поступила в редакцию
6.V 1978 г.

T. L. Ekhneva

IMMUNOLOGICAL MEMORY IN ANIMALS OF DIFFERENT AGE

Summary

Memory cells of CBA mice were studied using the model of adoptive transfer. It is revealed that the secondary response of the spleen cells of old primed donors is lower as compared with that of the same number of cells taken from young donors. The total number of cells of *primary immunological memory* (i.e. following single antigen administration) per the whole spleen of old animals was obviously somewhat decreased. Priming of donors with a smaller dose of antigen results in a more pronounced age-related differences in the secondary in vivo response. Maximal antibody production in the adoptive transfer system was observed on the 7th day following the cell transfer, regardless of donors' age.