

## ТРАФИК IgE И IgG В-КЛЕТОК В НИЗКОДОЗОВОЙ МОДЕЛИ АЛЛЕРГИИ НА Gal d1, 2, 3

Фаттахова Г.В.<sup>1</sup>, Макарова А.О.<sup>1,2</sup>, Коновалова М.В.<sup>1</sup>,  
Каширина Е.И.<sup>1</sup>, Коцарева О.Д.<sup>1</sup>, Окара П.С.<sup>3</sup>,  
Матушевская Е.В.<sup>4</sup>, Свиричевская Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени  
М.В. Ломоносова», Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства»,  
Москва, Россия

**Резюме.** Аллергия I типа опосредуется образованием IgE-антител к белкам, выделяемым нереплицирующимися микроорганизмами (пыльца растений, клещи домашней пыли и др.), попадающими на слизистые оболочки в очень низких концентрациях. Механизмы и локализация переключения наивных В-клеток на синтез IgE к аллергенам полностью не определены. Целью данной работы было определение места переключения В-клеток и трафик IgE-продуцирующих В-клеток у мышей, иммунизированных низкой дозой эквивалентной смеси белков куриных яиц Gal d1, Gal d2, Gal d3. Аллергены в физиологическом растворе вводили в холку мышей 9–10 раз с интервалом в 2–3 дня; общая доза составила 2,7 мкг на мышь. Продукцию IgE к белкам Gal d в крови и В-клетками, выделенным из холки, дренирующих лимфоузлов, селезенки и костного мозга иммунных мышей анализировали в динамике после прекращения сенсибилизации. Как в крови, так и в культурах *in vitro* доминирование IgE менялось с распознавания низкомолекулярного белка Gal d2 в течение сенсибилизации мышей на высокомолекулярный аллерген Gal d3 после отмены сенсибилизации. Показали, что формировался IgG ответ памяти, который появлялся только через месяц после окончания сенсибилизации. IgG формировался только к Gal d3, но не к другим аллергенам. Культуры *in vitro* показали, что В-клетки переключались на выработку IgE локально в холке с низким трафиком в селезенку, но не в лимфоузлы. В сыворотке крови титры IgE ко всем белкам Gal d снижались после прекращения сенсибилизации и сохранялись длительное время. В селезенке через месяц после отмены сенсибилизации появлялся пул В-клеток, продуцирующих IgE *in vitro*. Полученные результаты позволили сделать несколько выводов. 1) В-клетки переключаются на синтез IgE локально в месте попадания аллергена (холка). 2) Наблюдается преимущественное распознавание IgE антителами белков из пула аллергенов, причем ответ двухфазный: на раннем ответе распознается низкомолекулярный белок Gal d2; при ответе памяти распознается высокомолекулярный аллерген Gal d3. 3) В данной модели наблюдается

### Адрес для переписки:

Свиричевская Елена Викторовна  
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.: 8 (910) 464-87-60.  
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

### Address for correspondence:

Elena V. Svirshchevskaya  
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry  
16/10 Miklukho-Maklay St  
Moscow  
117997 Russian Federation  
Phone: +7 (910) 464-87-60.  
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

### Образец цитирования:

Г.В. Фаттахова, А.О. Макарова, М.В. Коновалова,  
Е.И. Каширина, О.Д. Коцарева, П.С. Окара,  
Е.В. Матушевская, Е.В. Свиричевская «Трафик IgE  
и IgG В-клеток в низкодозовой модели аллергии на  
Gal d1, 2, 3» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,  
№ 4. С. 733–740. doi: 10.15789/1563-0625-IAI-16635

© Фаттахова Г.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

G.V. Fattakhova, A.O. Makarova, M.V. Konovalova,  
O.D. Kotsareva, E.I. Kashirina, P.S. Okara,  
E.V. Matushevskaya, E.V. Svirshchevskaya “IgE and IgG  
B cell traffic in a low-dose Gal d1, 2, 3 allergy model”, *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,  
Vol. 26, no. 4, pp. 733–740.  
doi: 10.15789/1563-0625-IAI-16635

© Fattakhova G.V. et al., 2024

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IAI-16635

доминирование IgG ответа на высокомолекулярный белок Gal d3. Таким образом, показано, что при распознавании иммунной системой смеси белков, происходящих из аллергена, наблюдается доминирование белков, распознаваемых как IgE, так и IgG. Поскольку у больных аллергией чаще всего нет IgG-антител, то можно предположить, что в этом случае наблюдается поддерживаемый поступлением антигена ответ первой фазы, при котором распознаются низкомолекулярные белки IgE-антителами, но не формируется IgG ответ.

**Ключевые слова:** аллергия на куриные яйца, IgE, Gal d, трафик В-клеток, мышинная модель аллергии, локальное переключение В-клеток

## IgE AND IgG B CELL TRAFFIC IN A LOW-DOSE Gal d1, 2, 3 ALLERGY MODEL

Fattakhova G.V.<sup>a</sup>, Makarova A.O.<sup>a, b</sup>, Konovalova M.V.<sup>a</sup>,  
Kotsareva O.D.<sup>a</sup>, Kashirina E.I.<sup>a</sup>, Okara P.S.<sup>c</sup>, Matushevskaya E.V.<sup>d</sup>,  
Svirshchevskaya E.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Institute of Advanced Training, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Type I allergy is mediated by the formation of IgE antibodies to proteins secreted by non-replicating microorganisms (plant pollen, house dust mites, etc.) that enter the mucous membranes in very low concentrations. The mechanisms and localization of naive B cells' switching to IgE production have not been fully determined. The aim of this work was to determine the switching site of B cells and the traffic of IgE-producing B cells in mice immunized with a low dose of equimolar mixture of egg proteins Gal d1, Gal d2, and Gal d3. Allergens in saline solution were injected into the withers of mice 9–10 times with an interval of 2–3 days; the total dose was 2.7 µg/mouse. The production of IgE to Gal d proteins in the blood and by B cells isolated from the withers, draining lymph nodes, spleen, and bone marrow of immune mice was analyzed in dynamics after cessation of sensitization. Both in blood and in *in vitro* cultures, the dominance of IgE changed from the recognition of the LMW Gal d2 during the sensitization of mice to the HMW Gal d3 after sensitization was discontinued. In this model, an IgG memory response appeared only a month after the end of sensitization and recognized only Gal d3. *In vitro* cultures showed that B cells switched to IgE production locally in the withers with low traffic to the spleen. In the blood serum, IgE titers for all Gal d proteins decreased after the cessation of sensitization and persisted for a long time. A month after the cancellation of the sensitization, a pool of B cells producing IgE *in vitro* appeared in the spleen. These B-cells died after 20–30 days as no *in vitro* IgE production was observed later than 85–90 days. The results obtained allowed us to draw several conclusions. B cells switch to IgE synthesis locally at the site of allergen injections. The response was two-phase: LMW Gal d2 was recognized in the early response, while HMW Gal d3 was recognized in the late phase. In this model, the IgG response to HMW Gal d3 was clearly dominant. In conclusion, it has been shown that when the immune system recognizes a mixture of proteins originating from some allergen, the dominance of proteins recognized by both IgE and IgG is observed. Since allergy patients most often do not have IgG antibodies, it can be assumed that in this case an acute phase response, supported by antigen intake, is observed, in which LMW allergens are recognized.

**Keywords:** allergy to chicken eggs, IgE, Gal d, B cell traffic, mouse model of allergy, local switching of B cells

## Введение

Аллергены могут быть как корпускулярными (клещи домашней пыли, пыльца растений, споры грибов, фрагменты эпидермиса домашних животных и т. д.), так и растворимыми (пищевые аллергены, яд насекомых). Корпускулярные аллергены попадают в дыхательные пути, где

задерживаются на поверхности слизистых оболочек. Большинство из них вымывается секретом; меньшая часть захватывается резидентными фагоцитами и, как полагают, доставляется в дренирующие лимфатические узлы (ЛУ). Яды насекомых, по-видимому, попадают в кровоток и транспортируются в селезенку. Когда белко-

вый антиген достигает вторичных лимфоидных органов, дальнейший иммунный ответ будет зависеть от количества и формы чужеродных белков, захваченных и представленных иммунным клеткам [8, 14, 22]. Известно, что длительное поступление значительного количества антигена приводит к образованию специализированной ниши, специфичной для антигена и называемой зародышевым центром (ЗЦ) [9, 13]. Перед образованием ЗЦ небольшие иммунные кластеры, называемые экстрафолликулярными фокусами (ЭФФ), появляются вокруг фолликулярных дендритных клеток (ФДК), окруженных активированными аллергеном В-клетками и небольшим количеством фолликулярных Т-клеток. Увеличивающееся количество нагруженных антигенами В-клеток, накапливающихся в ЭФФ, индуцирует их созревание в ЗЦ. Скоординированное взаимодействие между ФДК, В- и Т-клетками в ЗЦ приводит к гипермутации В-клеток и отбору В-клеток, продуцирующих антитела к поступающему антигену. В случае ограниченного числа таких В-клеток зрелые ЗЦ, скорее всего, не будут образовываться. Показано, что В-клетки в ЭФФ могут гипермутировать, однако с низкой эффективностью [13]. Вероятно, это относится и к реакции на аллергены. Количество белков аллергенов, проникающих через барьеры организма, очень низкое. Аллергены не содержат адъювантных молекул, однако попадают через слизистые оболочки носа, легких (респираторные аллергены), полости рта и тонкого кишечника (пищевые аллергены), кожу (укусы членистоногих) в течение длительного времени. Соответственно, уровень доставки антигена будет длительным, но в небольшом количестве.

В настоящее время имеется достаточное количество работ, показывающих возможность локального образования ЭФФ в тканях. Образование лимфоидных ЭФФ в ткани полипов носа и бронхов у пациентов с хроническим риносинуситом и пневмонией было показано многими группами [1, 7, 9, 11]. Подтверждением локальной выработки IgE стало выявление IgE в грудном молоке или слезах при отсутствии IgE в крови [10, 12]. Пищевые аллергены предположительно проникают через тонкий кишечник. Нет данных, свидетельствующих об образовании ЭФФ в эпителии кишечника, однако более вероятно, что пищевая аллергия также инициируется не в кишечнике, а слизистой полости рта [2, 5, 6, 15].

Доля циркулирующего IgE в крови составляет менее 0,04% от концентрации IgG из-за высокого сродства к IgE рецептору типа I (FcεRI), экспрессируемого тканевыми резидентными тучными клетками [19]. Это затрудняет обнаружение IgE в крови. Идентификация В-клеток, секретирующих IgE, также представляет проблему из-за

экспрессии низкоаффинного рецептора FcγRII (CD23) многими иммунными клетками [13].

При моделировании аллергии часто используются адъюванты или высокомолекулярные носители для инициации первичного иммунного ответа на аллергены [16, 21]. Такие протоколы приводят к образованию высоких титров антител IgG, препятствующих IgE-ответу. Ранее мы показали, что в большинстве случаев в крови пациентов с аллергией, не проходивших аллерген-специфической терапии, отсутствуют IgG к аллергенам [20].

Участие ЗЦ в образовании IgE на мышиных моделях остается активной областью исследований. Было показано, что IgE<sup>+</sup>В-клетки подвергаются апоптозу внутри ЗЦ [18]. В целом до сих пор пути, регулирующие переключение В-клеток на синтез IgE *in vivo* и трафик IgE<sup>+</sup>В-клеток, изучены мало.

Аллергия характеризуется доминирующим распознаванием некоторых белков из аллергенов, называемых «основными» аллергенами [17]. Продолжительная аллергия приводит к распознаванию минорных белков аллергенов [3]. При этом нет данных, чем основные и минорные аллергены отличаются. Работ по моделированию на животных аллергической реакции на смесь аллергенов нет.

**Целью данной работы** был анализ места формирования и трафик В-клеток, секретирующих IgE и IgG, в модели аллергии на низкие дозы смеси аллергенов яичного белка. Показана иерархия иммунного ответа на смесь антигенов Gal d1, Gal d2, Gal d3 и формирование IgG<sup>+</sup> и IgE<sup>+</sup>В-клеток памяти.

## Материалы и методы

### Материалы

Рекомбинантные аллергены Gal d-белки были предоставлены Анной Долговой (Санкт-Петербургский институт Пастера, Санкт-Петербург, Россия). Использован липополисахарид (ЛПС) (Merck KGaA, Дармштадт, Германия).

### Мыши

Самки мышей BALB/c в возрасте 8-12 недель были получены из питомника «Столбовая» (Московская область, Россия). Протокол одобрен Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Центра исследований животных ИБХ РАН (разрешение № 326 от 16.08.2021).

### Гель-электрофорез

Gal d1, Gal d2, Gal d3 (30 мкг/линия) денатурировали при 95 °C в буфере для образцов Laemmli в течение 5 мин в восстановительных условиях (2-меркаптоэтанол). Белки разделяли в 10%-ном геле с использованием системы электрофореза Bio-Rad. Гели окрашивали PageBlue™ (Thermo Scientific, США), маркер молекулярной массы PageRuler™ (Thermo Scientific, США).



### Эксперименты *in vivo*

Антигены готовили в эквимольном соотношении Gal 1, Gal 2, Gal 3 в физрастворе (ФР) 6 мкг/мл, чтобы получить 300 нг суммарного белка в 50 мкл. Смесь фильтровали через фильтры 0,2 мкм, замораживали в аликвотах, достаточных для однократной иммунизации экспериментальных групп. Мышей ( $n = 30$ ) иммунизировали подкожно в область холки в течение 3–4 недель 2–3 раза в неделю. На 30–40-й день сенсибилизацию прекращали (три эксперимента). Контрольным мышам вводили только ФР. Кровь забирали из орбитального синуса глаза под анестезией изофлураном. Собранную сыворотку хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования.

Из каждой группы мышей умерщвляли перикардической дислокацией на дни 33, 46, 55, 61, 67, 76, 83 и 88 (рис. 1А). Холку, подмышечные ЛУ, селезенку и костный мозг собирали, гомогенизировали, трижды промывали физиологическим раствором и переносили в питательную среду. Клетки селезенки и костного мозга обрабатывали 0,86% буфером  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (рН 7,2) и промывали.

### Культуры *in vitro*

ЛУ, спленоциты и клетки костного мозга от иммунных и интактных мышей высевали из расчета  $5 \times 10^6$ /лунку на 24-луночные планшеты (Costar, США). Суспензия холки содержала менее  $0,2 \times 10^6$ /мышь. Все собранные клетки холки, включая стромальные и жировые, высевали в лунку. Клетки инкубировали в RPMI-1640 с добавлением 10%-ной фетальной телячьей сыворотки, пенициллина, стрептомицина и L-глутамина (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 50 мкг/мл ЛПС. Клетки инкубировали в течение 5 дней; надосадочные жидкости (НЖ) собирали, центрифугировали и замораживали до исследования.

### Иммуноферментный анализ

Растворы белков Gal d1, Gal d2, Gal d3 наносили по 5 мкг/мл на 96-луночные планшеты (Corning, Merck KGaA, Дармштадт, Германия) на ночь при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ . Планшеты трижды промывали ФР с фосфатным буфером (ФБ), содержащим 0,05% Твин-20, между всеми инкубациями. Для блокирования неспецифического связывания использовали ФБ с 2% бычьего альбумина. Сыворотку добавляли в разных разведениях. Культуральные супернатанты добавляли в количестве 200 мкл/лунку без дополнительного блокирующего буфера. Планшеты инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре или ночь. Для выявления IgE и IgG использовали соответствующие вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (Abscam, Великобритания), после промывки планшетов. Реакцию регистрировали с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Оптическую плотность при 450 нм определяли с помощью спектрофотометра MultiScan FC (Thermo Scientific, США). Титры в сыворотке крови оценивали путем приближения к фону, превышающего 3 стандартных отклонения от

фона. Результаты анализа НЖ показаны в виде оптической плотности (O.D. 450 нм).

### Статистический анализ

Графики были созданы с использованием программного обеспечения MS Excel. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM, по крайней мере для трех независимых экспериментов, или как один репрезентативный эксперимент из трех. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента. Уровни значимости  $p < 0,05$  считались статистически достоверными.

## Результаты и обсуждение

### Характеристика иммунного ответа на белки Gal d в низкодозовой модели аллергии

Мышей иммунизировали в холку 3 раза в неделю по 300 нг/мышь эквимольной смесью белков Gal d1 (28 кДа), Gal d2 (44 кДа) и Gal d3 (78 кДа) (Gal d) в ФР (рис. 1А, Б). Gal d1 образует стабильные димеры, что было визуализировано с помощью денатурирующего гель-электрофореза, и его молекулярную массу (MW) можно оценить как 56 кДа.

Сенсибилизацию проводили 9–10 раз в зависимости от эксперимента до образования IgE, а затем прекращали вводить аллергены. Уровень IgE и IgG оценивали в динамике в течение 2 месяцев после прекращения введения аллергена (рис. 1Б, В). Общая доза аллергенной нагрузки на мышь составила 2,7–3 мкг (рис. 1В). Титры сыворотки крови анализировали методом ИФА против индивидуальных белков.

На рисунке 1Г и Д приведена динамика ответов IgE и IgG на белки Gal d. Результаты показали, что во время сенсибилизации индуцировались наиболее высокие титры IgE к Gal d2, белку с условно наименьшей массой ( $p < 0,05$ , t-критерий). После прекращения стимуляции титры IgE ко всем белкам Gal d снижались в течение 20 дней и далее оставались стабильными на низком уровне (титры составляли 200–600) в течение 2 месяцев. При этом поменялось доминирование: более высокие титры регистрировали для высокомолекулярного белка Gal d3 (рис. 1Г).

Реакция IgG на все аллергены Gal d была низкой вплоть до 50 дня (рис. 1Д, 33-й день). Титры IgG к Gal d3, но не к Gal d1 и Gal d 2, резко увеличивались, начиная с 60 дня (30 дней после прекращения сенсибилизации).

Суммарные данные показали, что через месяц после окончания сенсибилизации доминировал как IgG, так и IgE ответ на высокомолекулярный аллерген Gal d3. При этом титры IgE оставались низкими, а титры IgG резко выросли, что свидетельствует о формировании  $\text{IgG}^+\text{B}$ -клетки памяти.

### Трафик В-клеток, продуцирующих Gal d-специфический IgE

Анализ аллерген-специфических иммуноглобулинов в крови не дает информации о месте переключения В-клеток на IgE или

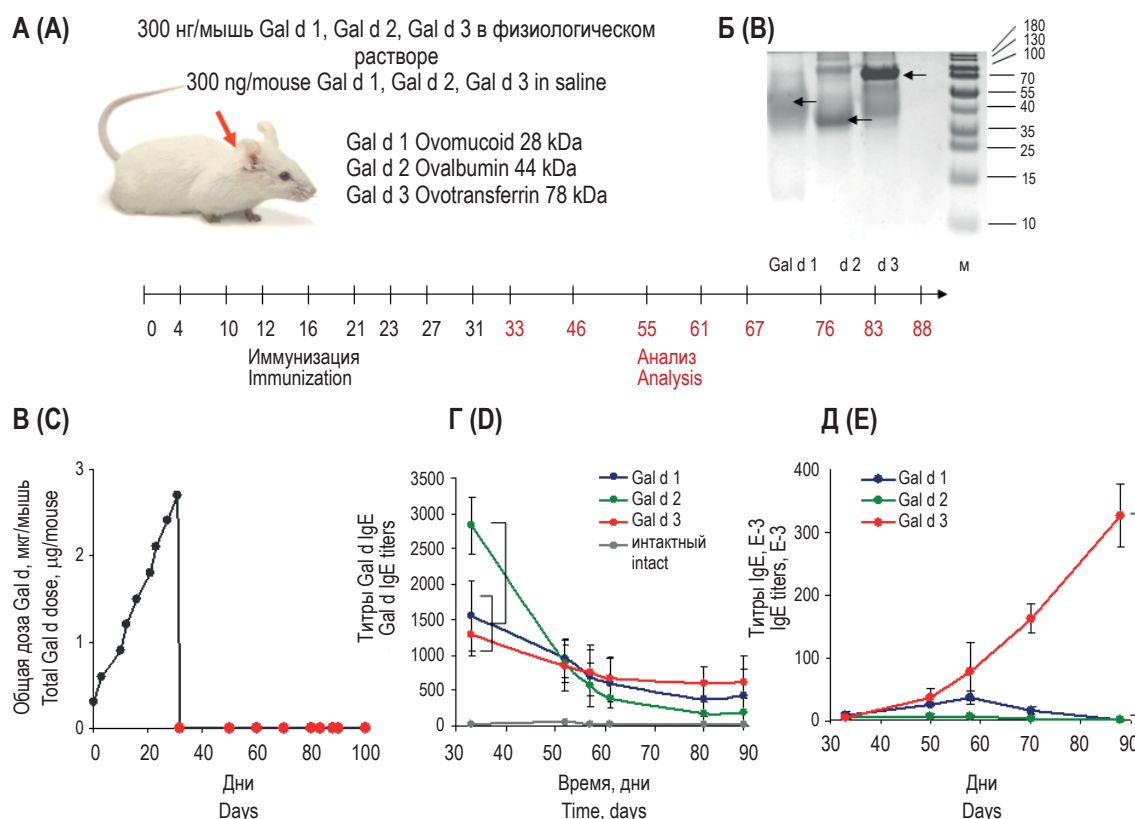


Рисунок 1. Gal d IgE и IgG-ответ в модели аллергии на низкие дозы

Примечание. А – схема эксперимента: мышам BALB/c вводили 9 раз по 300 нг/инъекция/мышь эквимоларной смеси Gal d 1, 2, 3 в физиологическом растворе в область холки (черные даты на шкале). Начиная с 33-го дня сенсibilизацию прекращали и анализировали иммунный ответ (красные даты на шкале). Б – денатурирующий 10%-ный гель-электрофорез белков Gal d. В – общая доза аллергенов на мышь (черные точки) и даты проведения анализа (красные точки). Г, Д – титры IgE (д) и IgG (е) в сыворотке крови мышей к белкам Gal d1 (синие символы), Gal d2 (зеленые символы), Gal d3 (красные символы) в динамике иммунного ответа памяти. Значимые различия отмечены скобками ( $p < 0,05$ , t-критерий). Приведены результаты одного репрезентативного эксперимента из трех.

Figure 1. Gal d IgE and IgG response in a low dose allergy model

Note. A, experimental scheme: BALB/c mice were injected 9 times with 300 ng/injection /mouse equimolar mixture Gal d 1, 2, 3 in saline solution in the withers area (black dots on the scale). Starting from day 33, sensitization was discontinued and the immune response was analyzed (red dots on the scale). B, denaturing 10% gel electrophoresis of Gal proteins d. C, total dose of allergens per mouse (black dots) and dates of analysis (red dots). D, E, titers of IgE (d) and IgG (e) in the blood serum of mice to the proteins Gal d1 (blue symbols), Gal d2 (green symbols), Gal d3 (red symbols) in the dynamics of the immune response of memory. Significant differences are marked with parentheses ( $p < 0.05$ , t-criterion). The results of one representative experiment out of three are presented.

IgG изотипы. Для выяснения этого вопроса клетки холки, ЛУ, селезенки и костного мозга сенсibilизированных мышей стимулировали *in vitro* ЛПС и собирали НЖ. Анализ IgE и IgG в НЖ показал присутствие IgE преимущественно в холке во время сенсibilизации и в течение 20-30 дней после отмены (рис. 2А). Титры IgE к Gal d1 и Gal d2 были достоверно выше, чем титры к Gal d3-специфичных IgE ( $p < 0,05$ , t-критерий), что коррелирует с уровнем IgE в крови в эти сроки. Следует отметить, что все культуры, кроме холки, содержали  $5 \times 10^6$  клеток/мл. Количество лимфоидных клеток в холке не превышало  $0,2 \times 10^6$  на мышь. Уровень IgE в НЖ снижался до нормы к 80-90-му дню.

Анализ клеток дренирующих ЛУ показал отсутствие накопления Gal d специфичных IgE<sup>+</sup>В-

клеток в ЛУ (рис. 2Б). Были обнаружены низкие уровни IgE к Gal d1 и Gal d3, но не к Gal d2, достоверно отличающиеся от контрольных культур. Возможно, что IgE<sup>+</sup>В-клетки мигрируют в другие лимфоидные органы либо погибают в ЛУ.

Продукция IgE к Gal d1, но не к Gal d2 и Gal d3 после отмены сенсibilизации была зарегистрирована в селезенке (рис. 2В). В костном мозге IgE<sup>+</sup>В-клетки не появлялись до 60-го дня (рис. 2Г).

Начиная с 60-го дня (30 дней после отмены сенсibilизации), IgE<sup>+</sup>В-клетки появились в селезенке и, в меньшем количестве, в костном мозге (рис. 2В, Г).

Суммируя полученные данные, показали, что основное место переключения В-клеток на синтез IgE происходит локально в месте по-

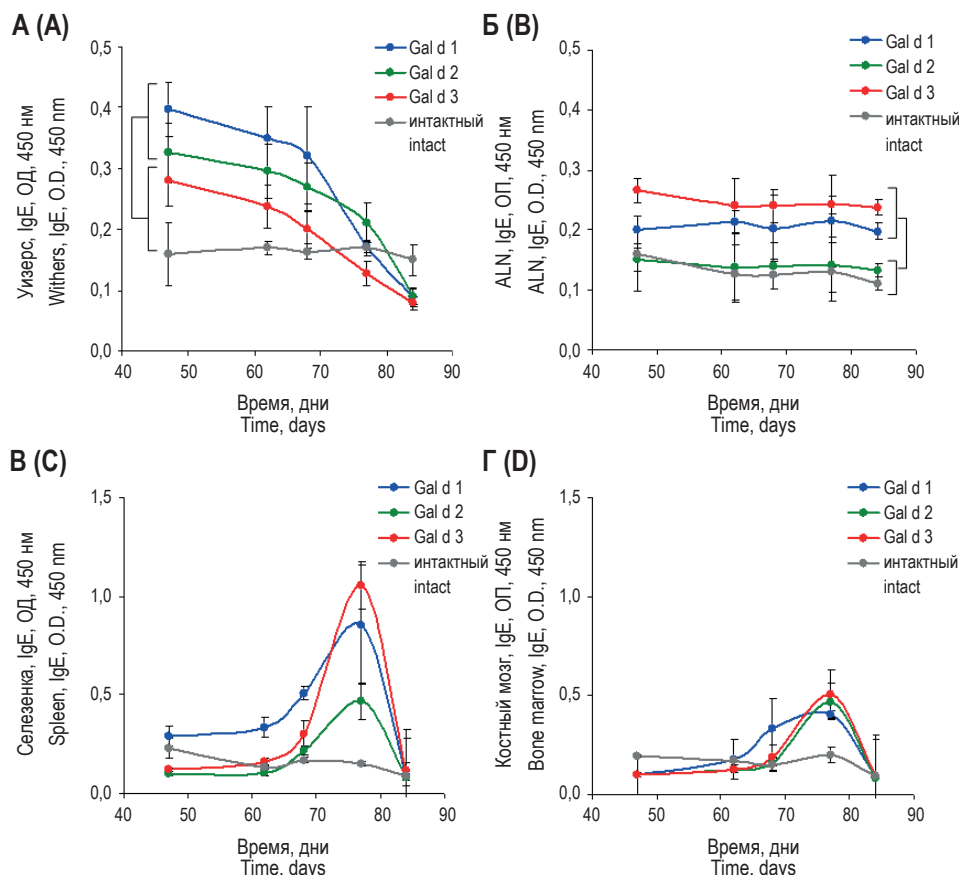


Рисунок 2. Трафик Gal-специфических IgE<sup>+</sup>B-клеток

Примечание. Клетки холки (А), подмышечных лимфатических узлов (ALN, Б), селезенки (В) и костного мозга (Г) иммунных и intactных мышей стимулировали *in vitro* 50 мкг/мл ЛПС и инкубировали в течение 5 дней. IgE, специфические к Gal d 1, 2, 3, анализировали в динамике иммунного ответа. Скобками указаны достоверные отличия от intactного контроля (t-критерий,  $p < 0,05$ ).

Figure 2. Traffic of Gal-specific IgE<sup>+</sup>B cells

Note. Cells of the withers (A), axillary lymph nodes (ALN, B), spleen (C) and bone marrow (D) of immune and intact mice were stimulated *in vitro* with 50  $\mu$ g/mL of LPS and incubated for 5 days. IgE specific to Gal d 1, 2, 3 were analyzed in the dynamics of the immune response. Significant differences from the intact control are indicated in parentheses (t-test,  $p < 0.05$ ).

падения аллергенов. Наблюдается трафик Gal d-специфических IgE<sup>+</sup>B-клеток в селезенку, где в течение месяца происходит стимуляция этих клеток, при этом наблюдается максимальная продукция IgE уже к Gal d 3. Именно такое доминирование титров IgE (Gal d3 > Gal d1 > Gal d2) наблюдается и в крови на поздних сроках (рис. 1Г, рис. 2В).

Соответственно наблюдается двухфазный ответ. Во время сенсibilизации (30-40 дней) наблюдается локальное (в холке) переключение В-клеток на синтез IgE в ЭФФ с доминированием ответа в ряду Gal d1≈Gal d2> Gal d3 и миграция части В-клеток в селезенку (возможно, через ЛУ). После отмены сенсibilизации часть В-клеток в холке, по-видимому, погибает, а часть мигрирует в селезенку, где формируются ЭФФ. В селезенке в ЭФФ IgE<sup>+</sup>B-клетки пролиферируют. При этом меняется доминирование ответа как в НЖ, так и в крови (Gal d3≈Gal d1> Gal d2) с преимуществом уже Gal d3 специфических В-клеток. Продукция

IgE заканчивалась к 80-90-му дню, что соответствует времени жизни IgE<sup>+</sup>B-клеток второй фазы в 30 дней.

## Закключение

Аллергией I типа страдает до 30% населения стран с высоким уровнем гигиены. Эволюционно IgE ответ формировался как протективный против многоклеточных паразитов. Механизмы формирования IgE антител до сих пор остаются спорными. Основной особенностью аллергического ответа является попадание на слизистые оболочки млекопитающих низких количеств чужеродных белков. Барьеры тела в норме эффективно защищают внутреннее пространство от окружающей среды. При генетической предрасположенности, вероятно, ассоциированной со структурой слизистых оболочек, аллергены в низком и очень низком количестве попадают в подслизистое пространство. В данной работе использована мо-

дель низкодозовой аллергии на мышах предрасположенной к формированию гуморального ответа линии BALB/c. Показали, что у мышей при длительном введении аллергенов в нанограммовых количествах и без адъювантов локально вместе введения формируются IgE и IgG к введенным белкам. После окончания сенсибилизации (например, окончание периода цветения или соблюдения элиминационной диеты) аллергический ответ затухает, но формируется ответ памяти, причем на один-два аллергена из пула белков, в нашей модели IgE ответ памяти формировался на высокомолекулярный белок Gal d 3. При повторной встрече с аллергеном иммунная реакция возобновляется. Нами ранее показано, что в сы-

воротках больных с аллергией практически нет IgG к этим белкам. Это позволяет предположить формирование самоподдерживающейся аллергической реакции с постепенным вовлечением других белков из-за локальной ниши, обогащенной цитокинами и хемокинами, способствующими активации В-клеток другой специфичности. Аллерген-специфическая терапия направлена на индукцию IgG ответа, что позволяет остановить цикл активации на конкретный аллерген.

## Благодарности

Выражаем благодарность Анне Долговой (Санкт-Петербургский институт Пастера, Санкт-Петербург, Россия) за предоставленные аллергены.

## Список литературы / References

1. Baba S., Kondo K., Toma-Hirano M., Kanaya K., Suzukawa K., Ushio M., Suzukawa M., Ohta K., Yamasoba T. Local increase in IgE and class switch recombination to IgE in nasal polyps in chronic rhinosinusitis. *Clin. Exp. Allergy*, 2014, Vol. 44, no. 5, pp. 701-712.
2. Blázquez A.B., Berin M.C. Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 7, pp. 4441-4450.
3. Caraballo L., Valenta R., Acevedo N., Zakzuk J. Are the terms major and minor allergens useful for precision allergology? *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 651500. doi: 10.3389/fimmu.2021.651500.
4. Chen Q., Xie M., Liu H., Dent A.L. Development of allergen-specific IgE in a food-allergy model requires precisely timed B cell stimulation and is inhibited by Fgl2. *Cell Rep.*, 2022, Vol. 39, no. 13, 110990. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110990.
5. Chinthrajah R.S., Hernandez J.D., Boyd S.D., Galli S.J., Nadeau K.C. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no. 4, pp. 984-997.
6. Chu D.K., Llop-Guevara A., Walker T.D., Flader K., Goncharova S., Boudreau J.E., Moore C.L., Seunghyun I.T., Wasserman S., Coyle A.J., Kolbeck R., Humbles A.A., Jordana M. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, no. 1, pp. 187-200.e1-8.
7. Feldman S., Kasjanski R., Poposki J., Hernandez D., Chen J.N., Norton J.E., Suh L., Carter R.G., Stevens W.W., Peters A.T., Kern R.C., Conley D.B., Tan B.K., Shintani-Smith S., Welch K.C., Grammer L.C., Harris K.E., Kato A., Schleimer R.P., Hulse K.E. Chronic airway inflammation provides a unique environment for B cell activation and antibody production. *Clin. Exp. Allergy*, 2017, Vol. 47, no. 4, pp. 457-466.
8. Gars E., Butzmann A., Ohgami R., Balakrishna J.P., O'Malley D.P. The life and death of the germinal center. *Ann. Diagn. Pathol.*, 2020, Vol. 44, 151421. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2019.151421.
9. Gevaert P., Nouri-Aria K.T., Wu H., Harper C.E., Takhar P., Fear D.J., Acke F., de Ruyck N., Banfield G., Kariyawasam H.H., Bachert C., Durham S.R., Gould H.J. Local receptor revision and class switching to IgE in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy*, 2013, Vol. 68, no. 1, pp. 55-63.
10. Hochwallner H., Alm J., Lupinek C., Johansson C., Mie A., Scheynius A., Valenta R. Transmission of allergen-specific IgG and IgE from maternal blood into breast milk visualized with microarray technology. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 5, pp. 1213-1215.
11. Kuroda E., Ozasa K., Temizoz B., Ohata K., Koo C.X., Kanuma T., Kusakabe T., Kobari S., Horie M., Morimoto Y., Nakajima S., Kabashima K., Ziegler S.F., Iwakura Y., Ise W., Kurosaki T., Nagatake T., Kunisawa J., Takemura N., Uematsu S., Hayashi M., Aoshi T., Kobiyama K., Coban C., Ishii K.J. Inhaled fine particles induce alveolar macrophage death and interleukin-1 $\alpha$  release to promote inducible bronchus-associated lymphoid tissue formation. *Immunity*, 2016, Vol. 45, no. 6, 1299-1310.
12. Leonardi A., Borghesan F., Faggian D., Plebani M. Microarray-based IgE detection in tears of patients with vernal keratoconjunctivitis. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2015, Vol. 26, no. 7, pp. 641-645.
13. MacLennan I.C., Toellner K.M., Cunningham A.F., Serre K., Sze D.M., Zúñiga E., Cook M.C., Vinuesa C.G. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.*, 2003, Vol. 194, pp. 8-18.
14. Manolova V., Flace A., Bauer M., Schwarz K., Saudan P., Bachmann M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 5, pp. 1404-1413.
15. Neeland M.R., Andorf S., Manohar M., Dunham D., Lyu S.C., Dang T.D., Peters R.L., Perrett K.P., Tang M.L.K., Saffery R., Koplin J.J., Nadeau K.C. Mass cytometry reveals cellular fingerprint associated with



IgE+ peanut tolerance and allergy in early life. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 1091. doi: 10.1038/s41467-020-14919-4.

16. Newman R., Tolar P. Chronic calcium signaling in IgE<sup>+</sup> B cells limits plasma cell differentiation and survival. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 12, pp. 2756-2771.e10.

17. Pomés A., Davies J.M., Gadermaier G., Hilger C., Holzhauser T., Lidholm J., Lopata A.L., Mueller G.A., Nandy A., Radauer C., Chan S.K., Jappe U., Kleine-Tebbe J., Thomas W.R., Chapman M.D., van Hage M., van Ree R., Vieths S., Raulf M., Goodman R.E.; WHO IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 100, pp. 3-13.

18. Saunders S.P., Ma E.G.M., Aranda C.J., Curotto de Lafaille M.A. Non-classical B cell memory of allergic IgE responses. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 715. doi: 10.3389/fimmu.2019.00715.

19. Shamji M.H., Valenta R., Jardetzky T., Verhasselt V., Durham S.R., Würtzen P.A., van Neerven R.J.J. The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease. *Allergy*, 2021, Vol. 76, no. 12, pp. 3627-3641.

20. Svirshchevskaya E., Fattakhova G., Khlgtian S., Chudakov D., Kashirina E., Ryazantsev D., Kotsareva O., Zavriev S. Direct versus sequential immunoglobulin switch in allergy and antiviral responses. *Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 170, pp. 31-38.

21. Takeda K., Gelfand E.W. Mouse models of allergic diseases. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009, Vol. 21, no. 6, pp. 660-665.

22. Thierry G.R., Kuka M., De Giovanni M., Mondor I., Brouilly N., Iannacone M., Bajénoff M. The conduit system exports locally secreted IgM from lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 2018, Vol. 215, no. 12, pp. 2972-2983.

#### Авторы:

**Фаттахова Г.В.** — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Макарова А.О.** — студентка бакалавриата ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; инженер-исследователь отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Коновалова М.В.** — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Коцарева О.Д.** — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Каширина Е.И.** — к.б.н., младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Окара П.С.** — студентка бакалавриата ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Матушевская Е.В.** — профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

**Свиричевская Е.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

#### Authors:

**Fattakhova G.V.**, PhD, MD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Makarova A.O.**, Undergraduate Student, Lomonosov Moscow State University; Research Engineer of the Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Konovalova M.V.**, PhD, MD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Kotsareva O.D.**, PhD, MD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Kashirina E.I.**, PhD, MD (Biology), Junior Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Okara P.S.**, Undergraduate Student, Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russian Federation

**Matushevskaya E.V.**, Professor, Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Institute of Advanced Training, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Svirshchevskaya E.V.**, PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 24.03.2024

Отправлена на доработку 25.03.2024

Принята к печати 26.03.2024

Received 24.03.2024

Revision received 25.03.2024

Accepted 26.03.2024