

ПРОЦЕССЫ ГОМЕОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ “ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА”

Е.В.Гойман, О.Т.Кудаева, Н.А.Ильина, В.И.Борисов,
В.С.Кожевников, О.П.Колесникова, В.А.Козлов

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Лимфопения, возникающая на раннем этапе развития хронической реакции “трансплантат против хозяина”, сопровождается возрастанием уровня ИЛ-7 в периферической крови и приводит к увеличению субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-клеток в селезенке реципиентов. Через 3 мес у части животных формируется аутоиммунный гломерулонефрит (*lupus-реципиенты*), при этом у них сохраняются повышенные уровни ИЛ-7 и Т-клеток с фенотипом клеток памяти (CD4⁺CD45RB^{low} и CD8⁺CD45RB^{low}) по сравнению с *nonlupus-реципиентами*, не имеющими признаков аутоиммунного заболевания, что может свидетельствовать об участии процессов гомеостатической пролиферации в формировании аутоиммунной патологии в данной модели.

Ключевые слова: гомеостатическая пролиферация, ИЛ-7, CD4⁺- и CD8⁺-субпопуляции, хроническая реакция “трансплантат против хозяина”

В последние годы в качестве одного из возможных механизмов развития аутоиммунных патологий рассматривается гомеостатическая пролиферация (ГП) — компенсаторное устранение количественного дефицита лимфоцитов путем включения их пролиферации на периферии [9]. ГП приводит к снижению разнообразия распознающих антигены рецепторов и появлению в значимом количестве аутореактивных эффекторных клеток [1,5,6,11]. Индукция хронической реакции “трансплантат против хозяина” (РТПХ) в полуаллогенной системе DBA/2→(C57Bl/6×DBA/2)F₁ вызывает формирование у части реципиентов иммунокомплексного гломерулонефрита аутоиммунного генеза, который по ряду признаков аналогичен нефриту при аутоиммунном заболевании человека — системной красной волчанке [2,10,14]. Поскольку ранние стадии развития хронической РТПХ сопровождаются выраженной лимфопенией [4], представлялось интересным исследовать

участие процессов ГП в возникновении аутоиммунной патологии при хронической РТПХ, индуцируемой в модели DBA/2→(C57Bl/6×DBA/2)F₁.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали мышей линии DBA/2 и гибридов (C57Bl/6×DBA/2)F₁ (B6D2F1) — самок в возрасте 2 мес, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986 г.).

Хроническую РТПХ индуцировали путем переноса гибридам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Клетки лимфатических узлов и селезенки вводили внутривенно реципиентам в дозе 60–70×10⁶ клеток двукратно с интервалом в 5 сут [10]. Контролем служили интактные животные того же генотипа, пола, возраста, что и в опыте.

Содержание популяций лимфоцитов CD4⁺, CD8⁺ и CD45RB^{low/high} определяли с помощью проточного цитометра "FACSCalibur" ("Becton Dickinson") по программе "CellQuest" ("Becton Dickinson").

Концентрацию ИЛ-7 в периферической крови определяли твердофазным вариантом метода ИФА ("R&D Systems").

Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем (Kunnsai brilliant blue, Loba Feinchemie) при $\lambda=570$ нм [7]. Калибровочную кривую строили по БСА (100-1000 мкг/мл), результаты выражали в мг/мл.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики; различия считали достоверными при $p<0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Острая РТПХ сопровождается резким снижением числа лимфоцитов. Хроническую РТПХ называют иммуностимуляторной, поскольку для нее характерна лимфопролиферативная реакция [14]. Однако оценка содержания лимфоцитов в периферической крови реципиентов в динамике выявила резкое снижение их количества на раннем этапе развития хронической РТПХ. Это снижение держится в течение первых 2 нед и затем сменяется лимфоцитозом с последующей нормализацией числа лимфоцитов в периферической крови до значений интактных животных на фоне развивающейся спленомегалии [4]. Поскольку процессы ГП сопровождаются изменением соотношения субпопуляций лимфоцитов и в первую очередь непропорциональным увеличением количества клеток памяти, мы оценивали количество наивных

клеток и клеток памяти среди CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов селезенки в разные периоды хронической РТПХ.

На начальных стадиях РТПХ обнаружено возрастание абсолютного количества CD4⁺- и CD8⁺-субпопуляций в селезенке, причем увеличивается число как наивных клеток CD4⁺CD45RB^{high} и CD8⁺CD45RB^{high}, так и клеток памяти CD4⁺CD45RB^{low} и CD8⁺CD45RB^{low} (рис. 1, а). В дальнейшем содержание клеток памяти CD4⁺CD45RB^{low} и CD8⁺CD45RB^{low} остается повышенным, тогда как количество наивных клеток CD4⁺CD45RB^{high} и CD8⁺CD45RB^{high} после подъема начинает снижаться (рис. 1, б). Увеличение численности субпопуляций в этот период может быть связано с трансплантацией большого количества клеток при индукции РТПХ, а также с пролиферацией антигенреактивных лимфоцитов донора и гомеостатической пролиферацией клеток реципиента.

Гомеостатическая пролиферация является общим свойством Т-, В- и НК-клеток в ответ на снижение их числа, при этом ГП разных популяций лимфоцитов требует наличия различных сигналов. Так, необходимым условием ГП наивных CD4⁺ Т-клеток является высокая концентрация ИЛ-7 и распознавание комплексов МНС с собственными пептидами, при этом интенсивность пролиферации находится в прямой зависимости от avidности взаимодействия. Считается, что ГП Т-клеток памяти поддерживается ИЛ-7, ИЛ-15 и менее зависит от распознавания аутопептидов [6,8,12,13,15].

Оценка уровня ИЛ-7 выявила его резкое возрастание в периферической крови реципиентов

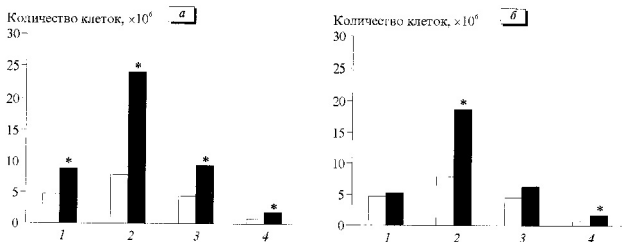


Рис. 1. Содержание субпопуляций клеток селезенки на ранних этапах развития хронической РТПХ. а — 1 нед после индукции РТПХ; б — 1 мес после индукции РТПХ. 1 — CD4⁺CD45RB^{high}; 2 — CD4⁺CD45RB^{low}; 3 — CD8⁺CD45RB^{high}; 4 — CD8⁺CD45RB^{low}. Светлые столбики — контрольная группа ($n=16$), темные — опытная группа ($n=16$). * $p<0.05$ по сравнению с контролем.

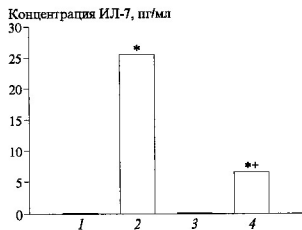


Рис. 2. Концентрация ИЛ-7 в периферической крови у экспериментальных животных после индукции хронической РТПХ.

1 — контроль ($n=16$); 2 — лимфопения ($n=16$); 3 — nonlupus-реципиенты ($n=8$); 4 — lupus-реципиенты ($n=8$). $p < 0.05$ по сравнению с * контролем, ** nonlupus-реципиентами.

в ранние сроки, сопровождающееся лимфопенией (рис. 2).

Дальнейшее развитие хронической РТПХ в данной модели приводит к формированию через 3 мес у части мышей аутоиммунного гломерулонефрита (lupus-реципиенты), о чем судили по появлению стойкой протеинурии (более 3 мг/мл), коррелирующей с морфологически подтвержденными патологическими изменениями в почечной ткани [2,3]. У таких lupus-реципиентов сохраняется повышенное содержание ИЛ-7 в периферической крови и $CD4^+$ - и $CD8^+$ -субпопуляций с фенотипом клеток памяти в селезенке по сравнению с контрольными животными и nonlupus-реципиентами без признаков аутоиммунной патологии (рис. 2, 3). У lupus-реципиентов также увеличивается число наивных $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клеток в селезенке, что может быть вызвано активацией процессов миграции из тимуса, который остается сохраненным при хронической форме РТПХ [1]. Несмотря на увеличение обеих $CD4^+$ -субпопуляций, соотношение сдвинуто в сторону клеток памяти (относительное содержание $CD4^+CD45RB^{low}$ у lupus-реципиентов составляет 75.8% при 62.1% в контроле, $p < 0.001$). На этой стадии хронической РТПХ Т-клеточный химеризм у реципиентов в изучаемой модели составляет всего 2% и представлен почти исключительно $CD4^+$ -клетками [14], таким образом, $CD4^+CD45RB^{low}$ - и $CD8^+CD45RB^{low}$ -клетки в селезенке lupus-мышей представляют собой в основном клетки реципиента. По-видимому, лимфопения, характерная для ранних стадий хронической РТПХ, вызывает у части реципиен-

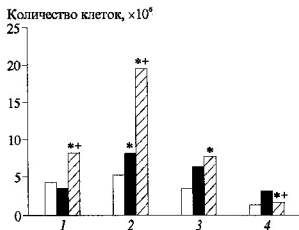


Рис. 3. Содержание субпопуляций клеток селезенки при хронической РТПХ.

1 — $CD4^+CD45RB^{high}$; 2 — $CD4^+CD45RB^{low}$; 3 — $CD8^+CD45RB^{high}$; 4 — $CD8^+CD45RB^{low}$. Светлые столбики — контрольная группа ($n=8$), темные — nonlupus-реципиенты ($n=8$), заштрихованные — lupus-реципиенты ($n=8$). $p < 0.05$ по сравнению с * контрольной группой, ** nonlupus-реципиентами.

тов ГП лимфоцитов, которая, в свою очередь, нарушает процессы поддержания толерантности клеток иммунной системы и стимулирует их аутоагрессию, приводя к развитию аутоиммунной патологии в данной модели.

Таким образом, процессы ГП участвуют в формировании аутоиммунной патологии, индуцированной хронической РТПХ в системе DBA/2 → (C57Bl/6 × DBA/2)_{F1}, которая может служить экспериментальной моделью для изучения закономерностей проявления ГП и возможности ее регуляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов В.А. // Иммунология. 2006. № 6. С. 378-382.
2. Козлов В.А., Кудяева О.Т., Колесникова О.П. и др. // Там же. 2002. № 3. С. 143-146.
3. Колесникова О.П., Кудяева О.Т., Логинов В.А. и др. // Вестн. АМН СССР. 1991. № 12. С. 13-16.
4. Ткачев В.О., Гойман Е.В., Лыков А.П. и др. // Иммунология. 2006. № 3. С. 168-171.
5. Ярилин А.А. // Там же. 2004. № 5. С. 312-320.
6. Baccala R., Theofilopoulos A.N. // Trends Immunol. 2005. Vol. 26, N 1. P. 5-8.
7. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248-254.
8. Fry T.J., Mackall C.L. // J. Immunol. 2005. Vol. 174, N 11. P. 6571-6576.
9. Khoruts A., Fraser J.M. // Immunol. Let. 2005. Vol. 98, N 1. P. 23-31.
10. Kimura M., Shimada K., Kanai Y. // Clin. Exp. Immunol. 1987. Vol. 69, N 2. P. 385-393.

11. *Marleau A.M., Sarvetnick N.* // *J. Leukoc. Biol.* 2005. Vol. 78, N 3. P. 575-584.
12. *Soares M.V., Borthwick N.J., Maini M.K. et al.* // *J. Immunol.* 1998. Vol. 161, N 11. P. 5909-5917.
13. *Surth C.D., Sprent J.* // *Immunity.* Vol. 29. P. 848-862.
14. *Via C.S., Shearer G.M.* // *Immunol. Today.* 1988. Vol. 9, N 7-8. P. 207-213.
15. *Woodland R.T., Schmidt M.R.* // *Semin. Immunol.* 2005. Vol. 17, N 3. P. 209-217.

Получено 07.05.09



Processes of Homeostatic Proliferation in the Pathogenesis of Autoimmune Glomerulonephritis Induced by Chronic Graft-Versus-Host Reaction

E. V. Goiman, O. T. Kudaeva, N. A. Ilyina, V. I. Borisov, V. S. Kozhevnikov, O. P. Kolesnikova, and V. A. Kozlov

Translated from *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, Vol. 149, No. 1, pp. 60-63, January, 2010
Original article submitted May 7, 2009

Lymphopenia developing at the early stage of chronic graft-versus-host reaction is associated with increased content of IL-7 in the peripheral blood and leads to an increase of the CD4⁺ and CD8⁺ cell subpopulations in the spleen of the recipient. After 3 months, some animals develop autoimmune glomerulonephritis (*lupus* recipients). High levels of IL-7 and T-cells with the memory cell phenotype (CD4⁺CD45RB^{low} and CD8⁺CD45RB^{low}) persist in these animals, in contrast to *nonlupus* recipients without signs of autoimmune disease. This can attest to the involvement of homeostatic proliferation processes in the formation of autoimmune disease in this model.

Key Words: *homeostatic proliferation; IL-7; CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations; chronic graft-versus-host reaction*

Homeostatic proliferation (HP), compensatory repair of quantitative deficit of lymphocytes by triggering their proliferation at the periphery, is now regarded as a possible mechanism of the development of autoimmune disease [9]. HP decreases the variety of antigen recognizing receptors and leads to the appearance of an appreciable amount of autoreactive effector cells [1,5,6,11]. Induction of chronic graft-versus-host reaction (GVHR) in the semiallogenic DBA/2→(C57Bl/6×DBA/2)F₁ system causes the formation of immunocomplex glomerulonephritis of autoimmune nature in some recipients, similar by some signs to nephritis in human autoimmune disease (systemic lupus erythematosus) [2,10,14]. Since the early stages of chronic GVHR development are associated with pronounced lymphopenia [4], it is essential to study the involvement of HP processes in the development of autoimmune disease in chronic GVHR induced in the DBA/2→(C57Bl/6×DBA/2)F₁ model.

Institute of Clinical Immunology, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia. **Address for correspondence:** L.Goiman@mail.ru. E. V. Goiman

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out on 2-month-old female DBA/2 mice and (C57Bl/6×DBA/2)F₁ (B6D2F1) hybrids from experimental biological laboratory animal clinic of Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences. The animals were kept in accordance with the regulations adopted by European Convention for Protection of Animals Used for Experimental and Other Research Purposes (Strasbourg, 1986).

Chronic GVHR was induced by transplantation of parental DBA/2 lymphoid cells to B6D2F1 hybrids. The lymph node and splenic cells were injected to recipients intravenously in a dose of 60-70×10⁶ cells, 2 injections at 5-day interval [10]. Intact sex- and age-matched animals of the same genotype served as the control.

The counts of CD4⁺, CD8⁺, and CD45RB^{low/high} lymphocyte subpopulations were evaluated by FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson) using the CellQuest software (Becton Dickinson).

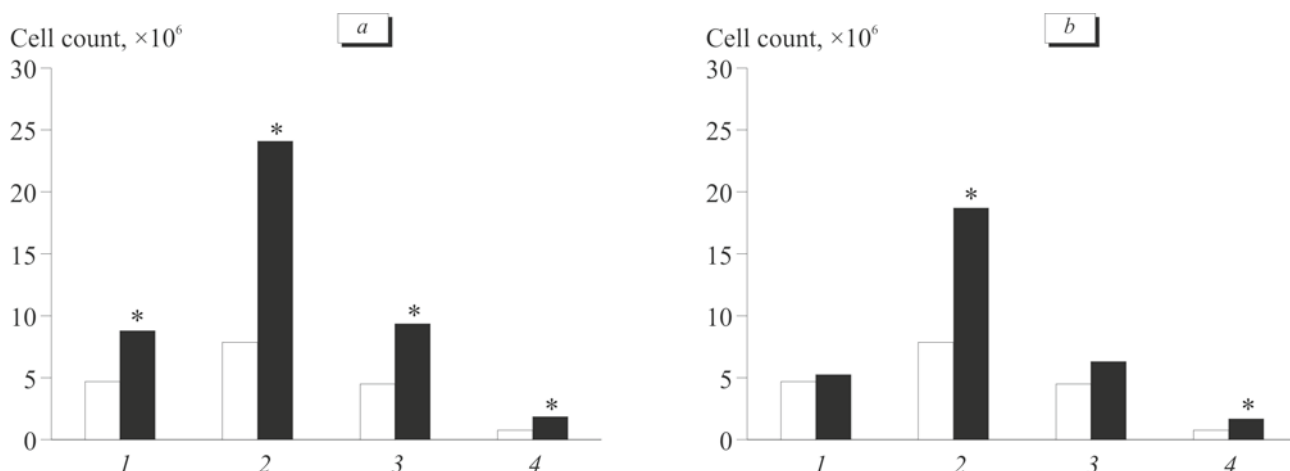


Fig. 1. Subpopulations of splenic cells at the early stages of chronic GVHR development. a) 1 week after GVHR induction; b) 1 month after GVHR induction. 1) CD4⁺CD45RB^{high}; 2) CD4⁺CD45RB^{low}; 3) CD8⁺CD45RB^{high}; 4) CD8⁺CD45RB^{low}. Light bars: control group (n=16); dark bars: experimental group (n=16). *p<0.05 compared to the control.

The concentration of IL-7 in the peripheral blood was measured by ELISA (R&D Systems).

Urinary protein was measured by colorimetry with Kumsai Brilliant Blue stain (Loba Feinchemie) at $\lambda=570$ nm [7]. The calibration curve was plotted by BSA (100-1000 μ g/ml), the results were expressed in mg/ml.

The results were statistically processed by non-parametric methods. The differences were considered significant at $p<0.05$.

RESULTS

Acute GVHR is associated with a drop of lymphocyte count. Chronic GVHR is called immunostimulatory, because of lymphoproliferative reaction characteristic of it [14]. However, measurements of lymphocyte

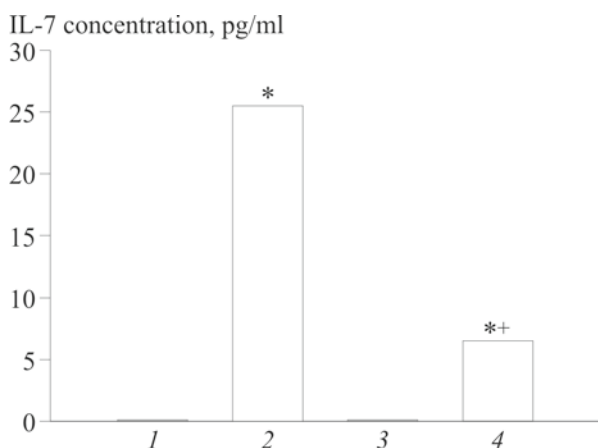


Fig. 2. Concentration of IL-7 in the peripheral blood of experimental animals after induction of chronic GVHR. 1) control (n=16); 2) lymphopenia (n=16); 3) nonlupus recipients (n=8); 4) lupus recipients (n=8). p<0.05 compared to: *control, *nonlupus recipients.

counts in the recipient peripheral blood over the course of experiment revealed its drastic decrease at the early stage of chronic GVHR development. This decrease persists throughout the first two weeks and then is replaced by lymphocytosis followed by normalization of lymphocyte count in the peripheral blood against the background developing splenomegalia [4]. Since HP is associated with changes in the proportion of lymphocyte subpopulations, primarily disproportional increase in memory cell count, we evaluated the counts of naive cells and memory cells among splenic CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes during different periods of chronic GVHR.

An increase in the absolute counts of CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations in the spleen was detected at the initial stages of GVHR. This increase involved CD4⁺CD45RB^{high} and CD8⁺CD45RB^{high} naive cells and CD4⁺CD45RB^{low} and CD8⁺CD45RB^{low} memory cells (Fig. 1, a). Then, the counts of CD4⁺CD45RB^{low} and CD8⁺CD45RB^{low} memory cells remained high, while the counts of CD4⁺CD45RB^{high} and CD8⁺CD45RB^{high} naive cells started to decrease after their elevation (Fig. 1, b). The increase in the subpopulation counts during this period can be caused by transplantation of many cells (GVHR induction) and by proliferation of donor antigen-reactive lymphocytes and HP of recipient cells.

HP is a common property of T-, B-, and NK cells in response to reduction of their counts; HP of different lymphocyte populations requires different signals. An obligatory condition for HP of naive CD4⁺ T-cell is high concentration of IL-7 and recognition of MNC complexes with autopeptides, the intensity of proliferation directly depends on avidity of this interaction. It is assumed that memory T-cell HP is supported by IL-7 and IL-15 and less depends on recognition of autopeptides [6,8,12,13,15].

The content of IL-7 in the peripheral blood of recipients sharply increased during the early period, paralleled by lymphopenia (Fig. 2).

The progress of chronic GVHR in this model leads to the formation (after 3 months) of autoimmune glomerulonephritis in some animals (*lupus* recipients); this was seen from the development of stable proteinuria (more than 3 mg/ml) correlating with morphologically verified pathological changes in the renal tissue [2,3]. These *lupus* recipients retain high levels of IL-7 in the peripheral blood and high counts of CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations in the spleen in comparison with control animals and *nonlupus* recipients without signs of autoimmune disease (Figs. 2 and 3). In addition, the counts of naive CD4⁺ and CD8⁺ cells in the spleen are elevated in *lupus* recipients, presumably due to stimulation of migration from the thymus, which remains intact in chronic GVHR [1]. Despite the increase in both CD4⁺ subpopulations, the proportion is shifted towards memory cells (CD4⁺CD45RB^{low} in *lupus* recipients is 75.8% constitute 62.1% in the control, $p < 0.001$). The T-cell chimerism at this stage of chronic GVHR in recipients in the studied model is just 2% and is presented almost exclusively by CD4⁺ cells [14], and hence, the CD4⁺CD45RB^{low} and CD8⁺CD45RB^{low} cells in the spleens of *lupus* mice are mainly recipient cells. It seems that lymphopenia characteristic of the early stages of chronic GVHR causes lymphocyte HP in some recipients, which, in turn, disturbs the maintenance of immune cell tolerance and stimulates their autoaggression, thus leading to the development of autoimmune disease in this model.

Hence, HP processes are involved in the formation of autoimmune disease induced by chronic GVHR in the DBA/2→(C57Bl/6×DBA/2)F₁ system, which can serve as an experimental model for studies of the regularities of HP development and possibility of its regulation.

REFERENCES

1. V. A. Kozlov, *Immunologiya*, No. 6, 378-382 (2006).

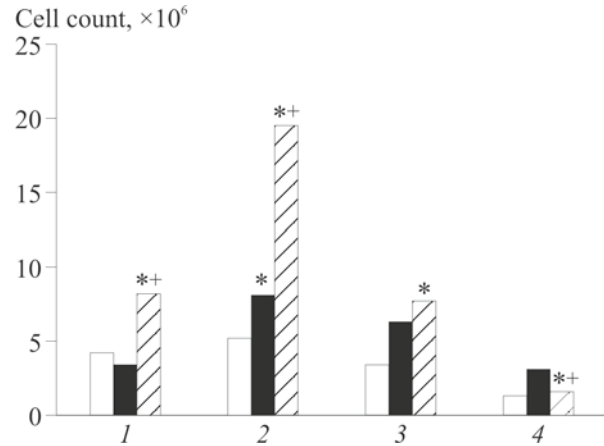


Fig. 3. Splenic cell subpopulation counts in chronic GVHR. 1) CD4⁺CD45RB^{high}; 2) CD4⁺CD45RB^{low}; 3) CD8⁺CD45RB^{high}; 4) CD8⁺CD45RB^{low}. Light bars: control group (n=8); dark bars: *nonlupus* recipients (n=8); cross-hatched bars: *lupus* recipients (n=8). $p < 0.05$ compared to: *control group, +*nonlupus* recipients.

2. V. A. Kozlov, O. T. Kudaeva, O. P. Kolesnikova, *et al.*, *Ibid.*, No. 3, 143-146 (2002).
3. O. P. Kolesnikova, O. T. Kudaeva, V. A. Loginov, *et al.*, *Vestn. Akad. Med. Nauk SSSR*, No. 12, 13-16 (1991).
4. V. O. Tkachyov, E. V. Goiman, A. P. Lykov, *et al.*, *Immunologiya*, No. 3, 168-171 (2006).
5. A. A. Yarilin, *Ibid.*, No. 5, 312-320 (2004).
6. R. Baccala and A. N. Theofilopoulos, *Trends Immunol.*, **26**, No. 1, 5-8 (2005).
7. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
8. T. J. Fry and C. L. M'kall, *J. Immunol.*, **174**, No. 11, 6571-6576 (2005).
9. A. Khoruts and J. M. Fraser, *Immunol. Lett.*, **98**, No. 1, 23-31 (2005).
10. M. Kimura, K. Shimada, and Y. Kanai, *Clin. Exp. Immunol.*, **69**, No. 2, 385-393 (1987).
11. A. M. Marleau and N. Sarvetnick, *J. Leukoc. Biol.*, **78**, No. 3, 575-584 (2005).
12. M. V. Soares, N. J. Borthwick, M. K. Maini, *et al.*, *J. Immunol.*, **161**, No. 11, 5909-5917 (1998).
13. C. D. Surth and J. Sprent, *Immunity*, **29**, No. 6, 848-862 (2008).
14. C. S. Via and G. M. Shearer, *Immunol. Today*, **9**, Nos. 7-8, 207-213 (1988).
15. R. T. Woodland and M. R. Schmidt, *Semin. Immunol.*, **17**, No. 3, 209-217 (2005).