

На правах рукописи

САФРОНОВА
Ирина Васильевна

**ХРОНИЧЕСКАЯ РТПХ КАК МОДЕЛЬ
ТН1- И ТН2-ЗАВИСИМЫХ
ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ.**

14.00.36 – аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2001

**Работа выполнена в ГУ НИИ клинической иммунологии
Сибирского Отделения РАМН**

Научный руководитель:

член-корреспондент РАМН, профессор,
доктор медицинских наук

В.А.Козлов

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук
доктор медицинских наук

**В.С. Кожевников
А.В. Шурлыгина**

Ведущая организация:

Российский государственный медицинский университет МЗ РФ

Защита состоится «.....»2001 г. вчас. на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Автореферат разослан «.....» 2001 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Кудаева

О.Т.Кудаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Реакция трансплантат против хозяина (РТПХ) - иммунная реакция клеточного типа, развивающаяся при трансплантации зрелых Т лимфоцитов неспособному к их отторжению хозяину в условиях тканевой несовместимости донора и реципиента (Шевелёв А.С., 1976; Ярилин А.А., 1999).

РТПХ – наиболее грозное осложнение при пересадках аллогенного костного мозга, часто приводящее к гибели пациента и ограничивающее эффективность этого метода лечения, являющегося составной частью комплексной терапии при онкологических и аутоиммунных заболеваниях, а также при радиационном поражении (Шевелёв А.С., 1976; Parkman R., 1993; Murphy W.J., Blazar B.R., 1999; Ferrara J.L., 2000).

РТПХ может проявляться в двух различных формах, острой, более тяжёлой по своим последствиям, и хронической, различающихся по иммунным механизмам и клиническим проявлениям. Терапия, направленная на уменьшение токсичности РТПХ, приводит к снижению эпизодов острой РТПХ, но, к сожалению, сопровождается возрастанием в качестве доминирующего осложнения хронического варианта реакции (Deeg H.J., Henslee-Downey P.J., 1990; Ferrara J.L. et al., 1996; Mackall C.L., Gress R.F., 1997; Murphy W.J., 2000). При хронической РТПХ могут наблюдаться поражения кожи, кишечника, нарушения гемо- и иммунопоэза с последующим иммунодефицитом и большим риском различных инфекций, а также развитие лимфопролиферативных процессов и аутоиммунной патологии (Ярилин А.А., 1999; Curtis R.E. et al., 1999; Rowlings P.A. et al., 1999).

В настоящее время РТПХ активно применяется для исследования широкого спектра иммунопатологических процессов на клеточном и молекулярном уровне, в частности, для моделирования в эксперименте аутоиммунных заболеваний человека (СКВ, склеродермия, синдром Шегрена, ревматоидный артрит) (Shoenfeld Y., Isenberg D.A., 1989; Fujiwara K. et al., 1991; Vidal S. et al., 1996; Shustov A. et al., 1998; Okamoto I. et al., 1999; Iwasaki T. et al., 2000). Изучение РТПХ позволяет охарактеризовать основные клеточные популяции, играющие патогенетическое значение в развитии заболеваний, и определить патофизиологические факторы организма, оказывающие регулируемую роль на их формирование (Krenger W., Ferrara J.L., 1996; Abdallah A.N. et al., 1997; Shustov A. et al., 2000).

РТПХ воспроизводится в эксперименте при переносе зрелых не совместимых по тканевым антигенам Т лимфоцитов реципиенту, не способному отторгать пересаженные клетки. Последнее достигается разными способами: использование в качестве реципиентов новорождённых животных или эмбрионов, подавление иммунной системы реципиента облучением или цитостатиками, индукция РТПХ в системе родитель-> гибрид F1. В последнем случае иммунные клетки любого из родителей при введении в организм гибрида реагируют против антигенных компонентов второй родительской линии, тогда как клетки гибридов F1 двух высокоинбредных линий не

отвечают на антигены каждой из родительских линий в связи с кодоминантным наследованием. При этом варианте нет необходимости в подавлении иммунной системы реципиента, что позволяет изучать развитие РТПХ при отсутствии изменений стромы лимфоидных органов, наблюдаемых после облучения реципиентов (Murphy W.J., 2000).

В связи с этим, в настоящее время в научных исследованиях активно используется модель РТПХ, индуцируемая переносом клеток родительских линий гибридам первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1. Именно на этой модели в последнее время получены данные, касающиеся клеточных и молекулярных механизмов развития реакции, регулирующей роли цитокинов, участия различных рецепторных молекул (Okamoto I. et al., 1999; Krenger W. et al., 2000; Brown G.R., Thiele D.L., 2000; Slayback D.L. et al., 2000). Особая привлекательность этой модели заключается в развитии разных форм РТПХ - острой или хронической - при переносе соответственно материнских (C57BL/6) или отцовских (DBA/2) лимфоидных клеток, при этом в последнем случае формируется аутоиммунный гломерулонефрит, по многим параметрам аналогичный аутоиммунному заболеванию человека - системной красной волчанке (СКВ). В нашей лаборатории было обнаружено, что при индукции хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2->(C57Bl/6xDBA/2)F1 несмотря на стандартные условия проведения реакции и генетическую однородность реципиентов формирование аутоиммунного гломерулонефрита наблюдается только у части животных. Разделённые по данному критерию на две группы реципиенты характеризовались разной степенью депрессии гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген, что предполагало участие разных иммунных механизмов в развитии реакции (Кудаева О.Т. и др., 1992).

Целью настоящего исследования было изучение иммунологических особенностей двух разных вариантов иммунопатологического состояния, развивающегося в результате хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2->(C57Bl/6xDBA/2)F1.

В соответствии с целью решались следующие задачи:

1. Изучить уровень гуморального и клеточного иммунного ответа в опытах *in vivo* и функциональную активность лимфоидных клеток (ответ на аллоантиген, Т- и В-клеточные митогены, синтез IgG в культуре спленоцитов и клеток костного мозга) в опытах *in vitro* в группах с разным клиническим течением хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2->(C57Bl/6xDBA/2)F1.
2. Изучить продукцию IL-1 при разных вариантах течения хронической РТПХ.
3. Охарактеризовать гормональный статус реципиентов (половые и глюкокортикоидные гормоны) с разными клиническими проявлениями хронической РТПХ.
4. Исследовать влияние воздействий, изменяющих соотношение Th1/Th2 и влияющих на пролиферативную активность стволовой клетки, на частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ.

Впервые показано, что индукция хронической реакции трансплантат против хозяина у генетически однородных реципиентов в полуаллогенной системе DBA/2->(C57Bl/6xDBA/2)F1 приводит к формированию Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояний.

Выявлены как сходство, так и различия в изменении иммунологических параметров при развитии двух вариантов иммунопатологии. В обеих группах реакция протекает по хроническому типу: наблюдается увеличение количества клеток в селезёнке и гипергаммаглобулинемия в периферической крови на фоне отсутствия выраженной атрофии тимуса. Th1-зависимая иммунопатология сопровождается глубокой ингибцией IgM- и IgG-ответа на T-зависимый антиген. В то же время, Th2-зависимая иммунопатология характеризуется снижением как гуморального, так и клеточного ответа на T-зависимый антиген, низким ответом спленоцитов на аллоантиген и T-клеточные митогены и формированием аутоиммунного гломерулонефрита. На фоне гипергаммаглобулинемии соотношение подклассов иммуноглобулинов IgG₁/IgG_{2a} в периферической крови реципиентов с разными вариантами иммунопатологии сдвинуто в сторону IgG_{2a} или IgG₁ по сравнению с интактным контролем, что свидетельствует о преимущественной активации соответственно Th1 или Th2-клеток.

Получены данные о возможных механизмах развития у генетически однородных реципиентов двух разных вариантов иммунопатологического состояния. Показано, что формирование аутоиммунного гломерулонефрита в данной модели не зависит от Ly1⁺ В клеток и сопряжено с поддержанием высоких уровней глюкокортикоидов и половых гормонов в организме реципиентов при развитии заболевания. Выявлена взаимосвязь между уровнем продукции IL-1 перитонеальными макрофагами реципиентов в начальные сроки после индукции хронической РТПХ и характером развивающейся иммунопатологии.

Установлена возможность модуляции течения хронической РТПХ под действием факторов, изменяющих соотношение Th1/Th2 в момент индукции реакции. Введение плазмиды pUC19, обладающей способностью стимулировать продукцию IL-12, способствует снижению частоты развития аутоиммунного гломерулонефрита и развитию у большей части реципиентов Th1- зависимого иммунопатологического состояния. Напротив, стимуляция Th2 путём введения адьюванта Фрейнда приводит к увеличению числа мышей с аутоиммунным гломерулонефритом, сдвигу начала заболевания на ранние сроки и более тяжёлому течению.

Ингибция пролиферации стволовой кроветворной клетки при хронической РТПХ значительно снижает частоту формирования аутоиммунного гломерулонефрита.

НАУЧНАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Показано, что хроническая РТПХ, индуцированная полуаллогенным переносом лимфоидных клеток в системе DBA/2->(C57Bl/6xDBA/2)F1, приводит к формированию Th1- или Th2-зависимых иммунопатологических

состояний. Реципиенты, у которых развиваются Th1- или Th2-зависимые иммунопатологические состояния, отличаются по уровню продукции IL-1 и гормональному статусу. Полученные данные представляют дополнительный материал для понимания механизмов формирования иммунопатологических заболеваний и их физиологической регуляции.

Влияя на баланс Th1/Th2 или пролиферативную активность стволовой кроветворной клетки, можно направлять развитие иммунопатологического процесса преимущественно по Th1- или Th2-зависимому пути и менять частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита. Таким образом, модель индукции хронической РТПХ в системе DBA/2->(C57Bl/6xDBA/2)F1 может использоваться для изучения препаратов, влияющих на развитие аутоиммунного гломерулонефрита, а также для тестирования воздействий, регулирующих баланс Th1/Th2.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

1. Индукция хронической РТПХ в системе DBA/2->(C57Bl/6xDBA/2)F1 приводит к развитию Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояний, характеризующихся разными изменениями иммунных параметров.
2. Формирование Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояний сопряжено с продукцией IL-1 и уровнем глюкокортикоидных и половых гормонов.
3. Воздействия, оказывающие влияние на соотношение Th1/Th2, изменяют течение реакции и частоту возникновения аутоиммунного гломерулонефрита.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные результаты работы представлены на II съезде иммунологов России (Сочи 1999); отчётных научных сессиях Института клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск 1997, 2000).

ПУБЛИКАЦИИ. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них 3 – в центральной печати.

ОБЪЁМ И СТРУКТУРА РАБОТЫ. Материалы диссертации изложены на 133 страницах машинописного текста, работа иллюстрирована 27 рисунками, 4 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературы в 3 главах, результатов исследования в 4 главах, их обсуждения и выводов. Список литературы включает 234 источника, из них 28 на русском языке.

Работа выполнена в лаборатории регуляции иммунопозза ГУ НИИКИ СО РАМН. Заведующий лабораторией – член-корреспондент РАМН, профессор, д.м.н. В.А. Козлов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования.

Животные: В работе использовали мышей самок гибридов первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1 и мышей самок и самцов DBA/2 и CBA, полученных из питомников «Столбовая» (Москва), «Рассвет» (Томск) и экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск). В опытах использовались мыши в возрасте 2-4 месяца.

Выделение органов, тканей и клеток проводили по стандартным методикам (Титова Л.Д. и др., 1982; Гольдберг Е.Д. и др., 1992).

Индукция хронической РТПХ у мышей осуществлялась путём переноса самкам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Каждая мышь - реципиент получала по 50×10^6 клеток путём внутривенной инъекции в хвостовую вену в объёме 0,5 мл среды двукратно с интервалом в пять дней (Kimura M. et al., 1987). О развитии гломерулонефрита судили по стойкому появлению белка в моче (трёхкратное определение белка колориметрически с Kumsai brilliant blue с помощью Titertec Multiskan, длина волны λ 570 nm; калибровочная кривая по BSA (100-1000 мкг/мл) более 3 г/л).

Определение показателя гематокрита. Показатель гематокрита определяли при помощи микроцентрифуги МЦГ-8. По отсчётной шкале, приложенной к центрифуге, измеряли величину гематокрита в % (Меньшиков В.В., 1987).

Постановка пробы Кумбса. Непрямую и прямую пробу Кумбса проводили по стандартной методике (Вязов О.Е. и др., 1973).

Фазы полового цикла оценивали по влагалищным мазкам (Киршенблат Я.Д., 1969).

Для определение содержания кортикостерона в сыворотке крови проводили забор крови у мышей реципиентов из хвостовой вены прижизненно (Титова Л.Д. и др., 1982) с последующим центрифугированием, замораживанием сыворотки и хранением при температуре -20°C . Содержание кортикостерона в сыворотке крови мышей определяли методом конкурентного белкового связывания (Тинников А.А. и др., 1984). Данный раздел работы проводился на базе лаборатории эндокринологии ИЦиГ СО РАН.

Морфологический анализ органов мышей-гибридов B6D2F1 как интактных, так и с РТПХ - индуцированной иммунопатологией, проводили методом обзорной микроскопии и общегистологическими полуколичественными методами совместно с сотрудниками Института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН к.м.н. В.А. Логиновым и к.м.н. Л.А. Обуховой по стандартным методикам (Автандилов Г.Г., 1990). Степень поражения почек оценивали по шкале 0-4 (Yoshioko H. et al., 1989; Murasami M. et al., 1995).

Оценка клеточного и гуморального звеньев иммунитета in vivo. Клеточный иммунитет (реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)) оценивали по степени выраженности отёка лапы после введения разрешающей дозы ЭБ сенсibilизированным животным по стандартной методике (Yoshikai Y. et al., 1979). Гуморальный иммунный ответ на ЭБ оценивали на пике ответа, свойственного данным гибридам, на пятые (IgM-АОК) и девятые (IgG-АОК) сутки по количеству локальных зон гемолиза в жидкой среде после внутривенного введения 2×10^8 ЭБ (Cunningham A.J., 1965).

Пролиферативной ответ спленоцитов на Т- и В- клеточные митогены (LPS *E.coli* 055:B5, Con A, PWM) и аллоантигены тестировали по включению ^3H -тимидина в культуре in vitro. Оптимальные дозы LPS, Con A и PWM, определённые в предварительных опытах, составили 15 мкг/мл, 2 мкг/мл и 1 мкг/мл соответственно. В смешанной культуре лимфоцитов в качестве

стимуляторов использовались клетки селезёнки мышей СВА, преинкубированные с митомицином С (Лефковитс И., 1981).

Тестирование биологической активности ИЛ-1 в супернатантах перитонеальных макрофагов определяли по методу, основанному на способности данного цитокина усиливать пролиферативный ответ тимоцитов на субоптимальную дозу митогена (ConA) (Phillips R. et al, 1983; Cavaillon J.M., 1989). Результаты выражали в индексах стимуляции (ИС).

Оценка пролиферативной активности стволовой кроветворной клетки проводили по общепринятой методике с использованием 0,9% метилцеллюлозной культуры (Гольдберг Е.Д. и др., 1992).

Уровень IgG в периферической крови и супернатантах спленоцитов и клеток костного мозга, содержание подклассов IgG₁ и IgG_{2a} и ауто-ДНК антител в сыворотке крови определяли твёрдофазным вариантом метода иммуноферментного анализа (Д. Кэтти, 1991). Результаты выражали как в абсолютных значениях (мг/мл, мкг/мл), так и в индексах влияния (ИВ). Титры аутоантител выражали в логарифмических единицах: 1:50 - 1, 1:100 - 2, 1:200 - 3 и т.д. Часть результатов данного раздела получена совместно с сотрудниками Института биоорганической химии СО РАН, к.б.н. П.П. Лактионовым и к.б.н. Е.Ю. Рыковой.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрических критериев U Вилкоксона-Манна-Уитни, точного метода Фишера, коэффициента ранговой корреляции Спирмэна (Гублер Е.В., 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2->(C57Bl/6xDBA/2)F1.

Известно, что индукция хронической РТПХ у гибридов (C57Bl/6xDBA/2)F1 путём переноса лимфоидных клеток мышей линии DBA/2 приводит к развитию аутоиммунной патологии, которая по клиническим и патоморфологическим признакам аналогична СКВ человека: персистенция лимфоидной гиперплазии, формирование аутоантител, развитие морфологических признаков иммунокомплексного гломерулонефрита (Via C. S. et al. 1988).

В наших опытах развитие аутоиммунного гломерулонефрита наблюдалось всегда только у части животных. О развитии гломерулонефрита судили по стойкому появлению белка в моче более 3 г/л (трёхкратное определение с интервалом в неделю), что коррелирует с морфологическим подтверждением болезни (Колесникова О.П. и др., 1991). Основываясь на концентрации белка в моче, мы формировали группы животных со стойкой протеинурией (группа pr+) и без протеинурии (группа pr-), то есть когда содержание белка в моче было на уровне контрольной интактной группы. Дальнейшее изучение проводили, сравнивая количественное распределение опытных мышей и иммунные параметры этих двух групп.

Влияние количества перенесённых клеток и способа введения на частоту развития гломерулонефрита. Формирование аутоиммунного

гломерулонефрита при РТПХ зависит от размера инокулята. Число мышей с протеинурией резко снижается, если количество трансплантируемых клеток становится меньше $100 \cdot 10^6$. При увеличении количества трансплантируемых клеток до $130-150 \cdot 10^6$ частота развития аутоиммунного гломерулонефрита возрастает и составляет 50% через 16 недель после индукции хронической РТПХ. Однако это достигается только при внутривенном введении клеток донора, внутрибрюшинный способ переноса клеток не приводит к развитию аутоиммунного гломерулонефрита даже при больших дозах трансплантируемых клеток.

Характеристика клинических проявлений хронической РТПХ.

Морфологическая характеристика поражения почек. Морфологическое изучение показало, что грубые изменения почечной ткани отмечаются в группе животных с протеинурией (группа $pr+$). У животных без протеинурии (группа $pr-$) фиксируются незначительные патоморфологические сдвиги (Сафронова И.В. и др., 1999).

Выраженность признаков хронической РТПХ.

1. Количество клеток селезёнки. Характерной особенностью хронической РТПХ является увеличение количества клеток селезёнки, что является проявлением лимфопролиферативных процессов (Via C.S., Shearer G.M., 1988). Изучение этого показателя у реципиентов показало, что РТПХ развивается по хроническому типу в обеих группах; реакция более выражена в группе $pr+$ (количество клеток в селезёнке относительно контроля составляет в группе ($pr-$) 1,3; в группе ($pr+$) 1,6; $p < 0,05$ по сравнению с контролем).

2. Морфология тимуса. Известно, что при острой РТПХ уже в ранние сроки наблюдается деструкция тимуса вплоть до его полной атрофии. При хронической форме РТПХ изменения тимуса незначительны (Krenger W. et al., 2000). Морфометрическое исследование тимуса показало, что в обеих исследуемых группах структура коры и мозгового вещества сохранена, плотность расположения лимфоидных элементов достоверно не отличается от контроля, в субкапсулярной и внутренней зонах коры увеличено количество макрофагов. У мышей $pr+$ относительный объем коркового вещества достоверно снижен по сравнению с мышами $pr-$.

3. Поликлональная активация В клеток. Известно, что одним из признаков хронической РТПХ является поликлональная активация В клеток, следствием которой является высокий уровень IgG в сыворотке крови и продукция аутоантител (Mortis S.C., 1990). Определение содержания основного иммуноглобулина крови IgG в динамике после индукции РТПХ показало, что наблюдается повышение уровня IgG у реципиентов в обеих группах, но динамика и выраженность гипергаммаглобулинемии различаются: у мышей $pr+$ увеличение содержания IgG в периферической крови начинается раньше и достигает больших значений.

Оценка эффекторных функций иммунной системы.

Определение количества В лимфоцитов $Ly1^+$ в селезёнке реципиентов. Имеются данные, что в патогенезе некоторых аутоиммунных заболеваний важное значение имеют В клетки, несущие на своей поверхности маркер CD5

(Ly1⁺) (Shoenfeld Y., Isenberg D.A., 1989). Число Ly1⁺ В клеток оценивали по количеству клеток в селезёнке реципиентов, образующих антитела против компонентов собственных эритроцитов, обработанных бромелаином (Br-MRBC-АОК), спонтанно или после стимуляции LPS (Cunnigham A. J., 1974; Mercolino T.J. et al., 1988). Фоновое содержание таких клеток у B6D2F1 невелико, достоверно не отличается у опытных и контрольных животных (233 в контроле, 876 в группе мышей pr- и 140 в группе pr+). Количество LPS-индуцированных Br-MRBC-АОК достоверно снижено у реципиентов по сравнению с контролем (2826 ауто-АОК в контроле, 390 и 1170 ауто-АОК в группе мышей pr- и pr+ соответственно); при этом достоверные различия отмечаются и между опытными группами. По-видимому, механизм развития аутоиммунной патологии при индукции хронической РТПХ не обусловлен Ly1⁺В клетками.

Иммунный ответ на Т-зависимый антиген. Определение количества специфических IgM- и IgG-АОК в селезёнке реципиентов на пике иммунного ответа выявило значительное подавление гуморального иммунного ответа. Достоверное снижение количества IgM- и IgG-АОК наблюдается у всех реципиентов; в группе мышей pr- депрессия антителообразования более глубокая, чем в группе животных pr+ (рис. 1). Значительное подавление гуморального иммунного ответа у мышей без протеинурии сохраняется до конца наблюдения (17 месяцев с момента индукции хронической РТПХ): в группе интактных мышей количество IgG-АОК на селезёнку составило 3.702, в опытной группе - 322 на селезёнку.

Определение уровня клеточного ответа на тот же антиген (ЭБ) показало, что у животных с протеинурией (группа pr+) отмечается достоверное снижение реакции ГЗТ, в то время как у животных без протеинурии ответ не отличается от контроля (рис. 2).

Пролиферативный ответ спленоцитов в смешанной культуре лимфоцитов. В группе животных pr- пролиферативный ответ спленоцитов в СКЛ не отличается от контроля, в то время как в группе животных pr+ отмечается достоверное ($p < 0,05$) снижение ответа по сравнению как с мышами pr-, так и с контрольными животными (рис.3).

Пролиферативный ответ спленоцитов на Т- и В-клеточные митогены. Изучение пролиферативного ответа клеток селезёнки на Т- и В - клеточные митогены выявило достоверное снижение ConA и PWM – стимулированной пролиферации спленоцитов мышей pr+ по сравнению с группой pr- и интактными мышами; ответ на LPS не изменялся (рис. 4).

Синтез IgG в культуре спленоцитов и клеток костного мозга реципиентов.

Показано, что при хронической РТПХ наряду с лимфопролиферацией наблюдается ингибция гуморального иммунного ответа на Т-зависимые антигены (Kimura M, Gleichmann E., 1987; Tschetter J. R. et al., 2000). Причиной подавления продукции специфических антител может быть повреждение антиген-презентирующих клеток, высокий уровень продукции IFN-β, изменение В лимфоцитов (Cleveland M.G. et al., 1987; Kimura M, Gleichmann E., 1987; Gonzalez M. et al., 1995; Haridas V., Kamat R.S., 1997).

Рисунок 1. Содержание IgM- и IgG-АОК в селезёнке мышей В6D2F1 после индукции хронической РТПХ.

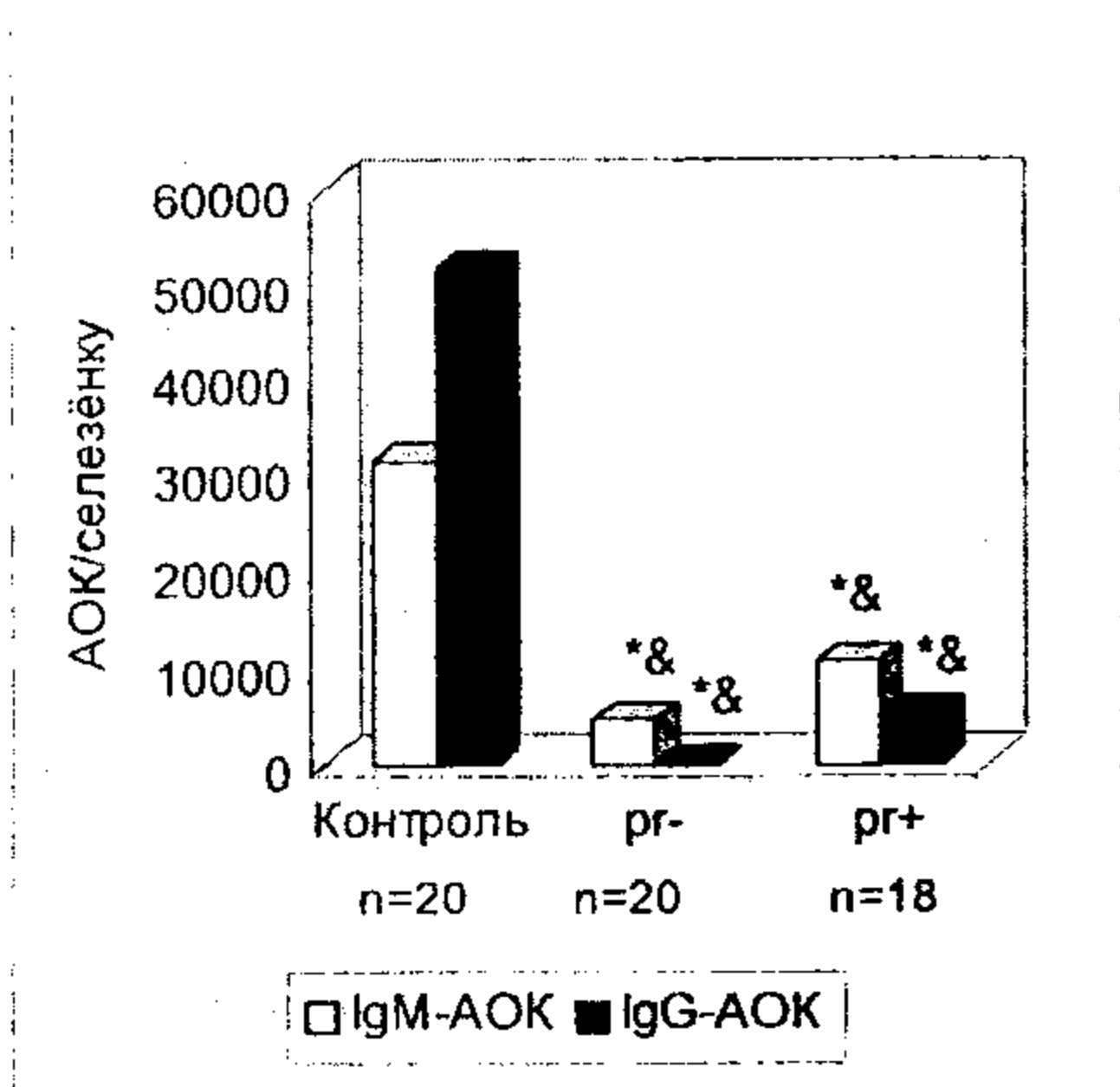


Рисунок 2. Выраженность реакции ГЗТ у мышей В6D2F1 после индукции хронической РТПХ.

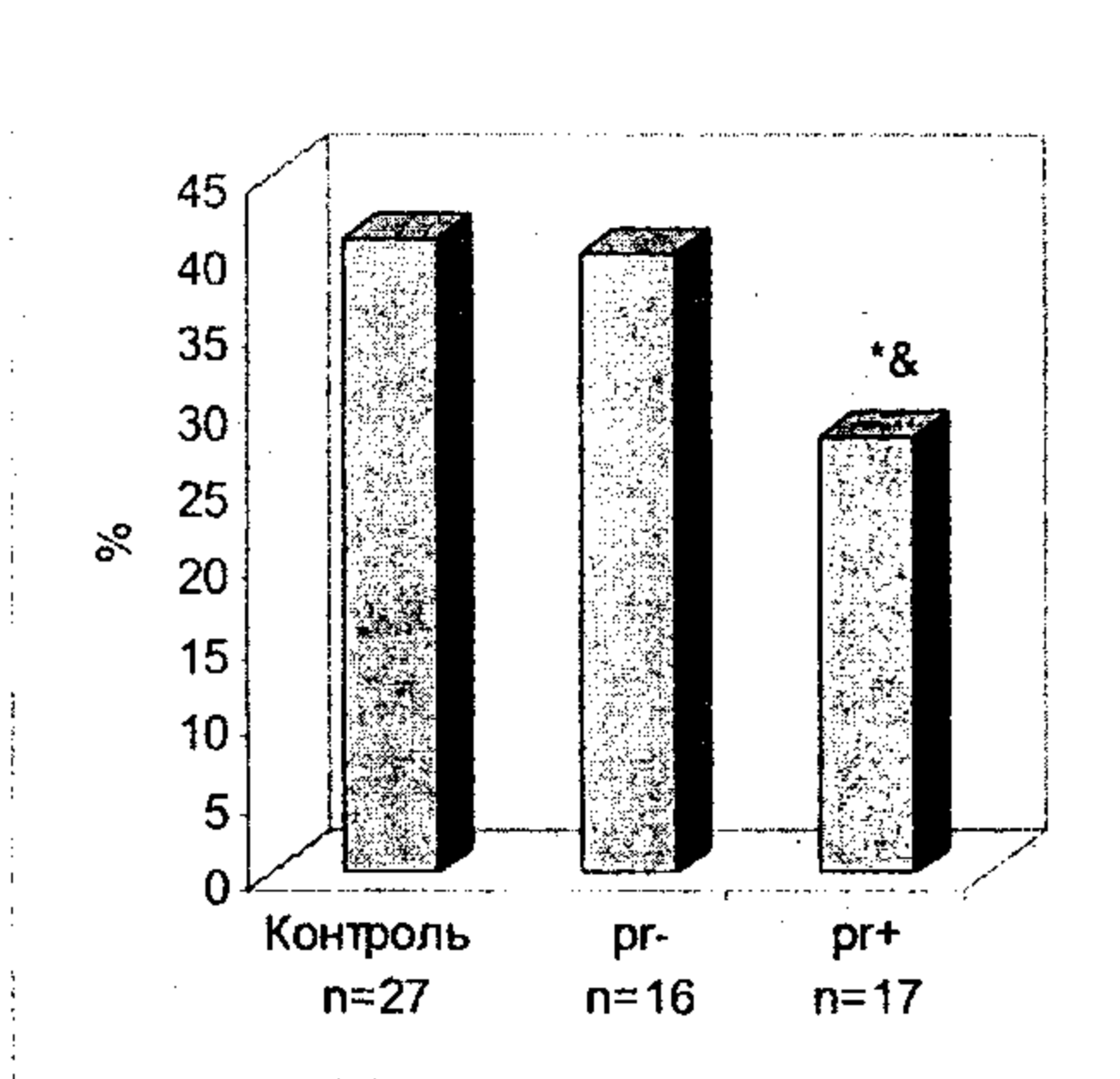


Рисунок 3. Пролиферативный ответ спленоцитов мышей В6D2F1 в СКЛ после индукции хронической РТПХ.

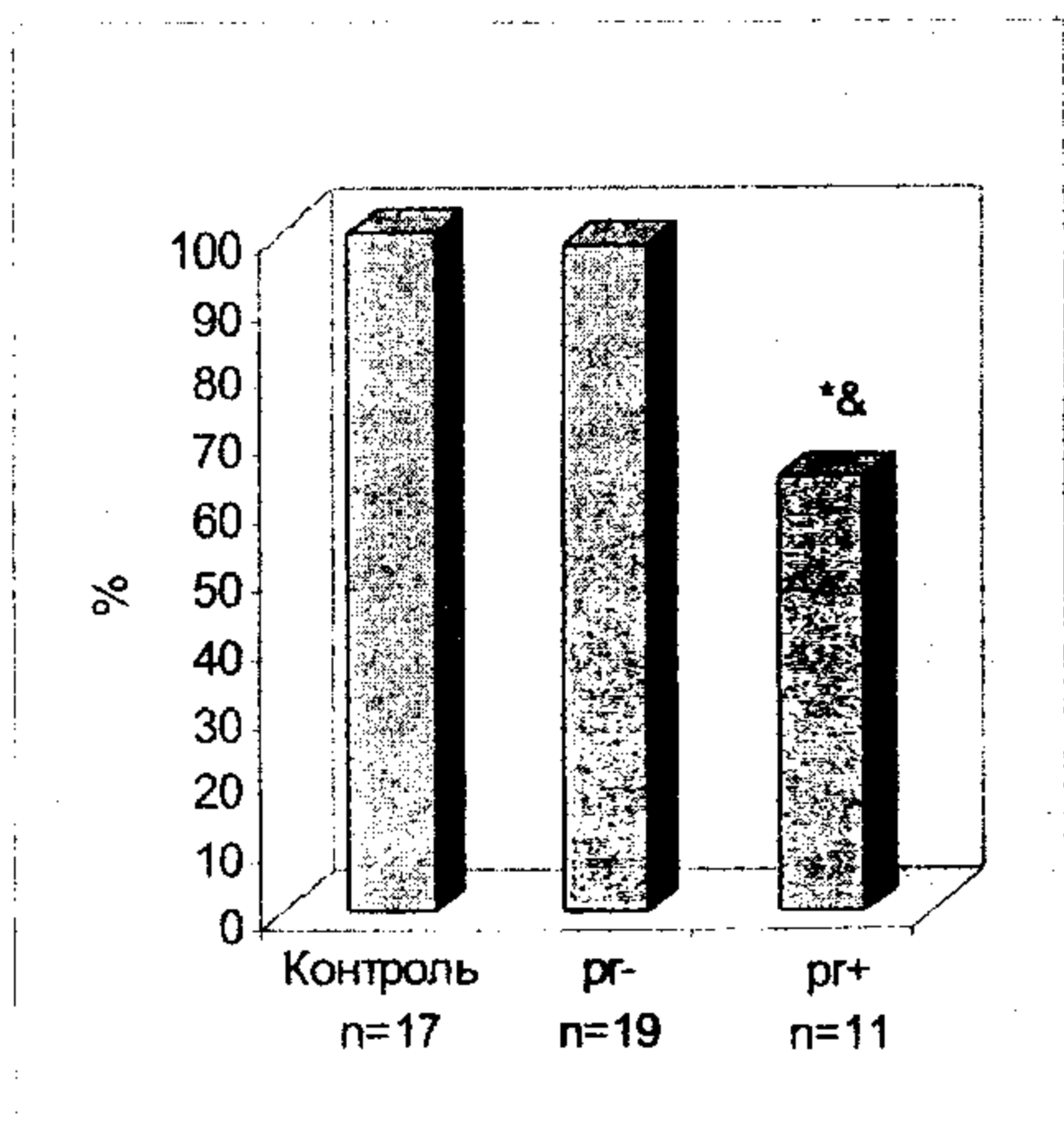
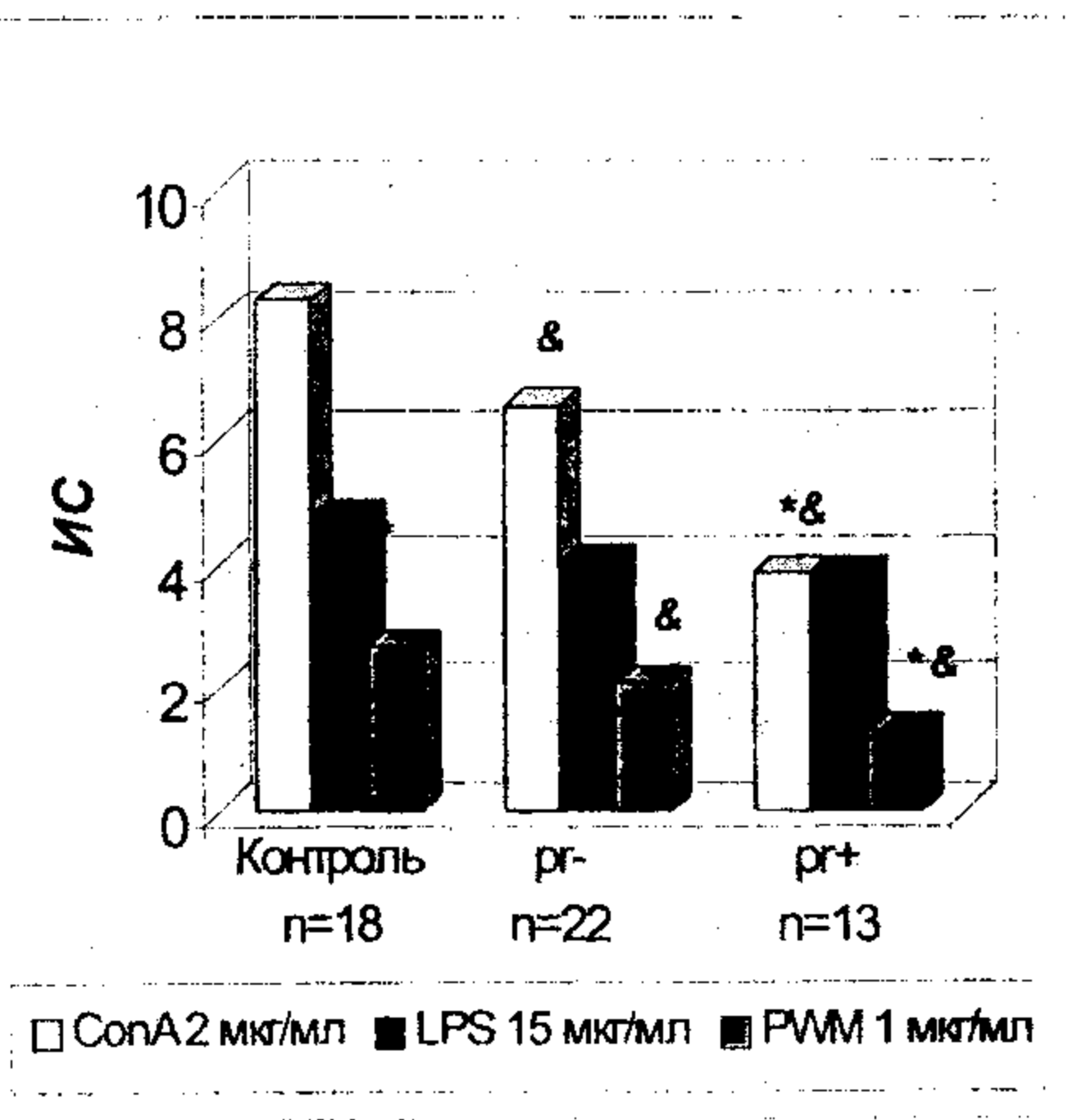


Рисунок 4. Митоген-индуцированная пролиферация клеток селезёнки мышей В6D2F1 после индукции хронической РТПХ.



Примечание. Здесь и далее

* $p < 0,05$ относительно контроля

& $p < 0,05$ относительно сравниваемых групп (pr- и pr+).

Так как в наших опытах на фоне высокого уровня IgG в периферической крови наблюдается супрессия гуморального ответа, мы оценивали синтез IgG в культуре спленоцитов и клеток костного мозга мышей реципиентов. Продукция IgG клетками селезёнки опытных мышей не отличается от контроля; клетки костного мозга опытных мышей синтезируют повышенное количество IgG по сравнению с контролем (ИБ в контроле составляет 1,25; в группах rg- и rg+ 1,56 и 1,44 соответственно; $p < 0,05$). Таким образом, за подъём сывороточного уровня IgG, по видимому, ответственны клетки костного мозга. Не обнаружено подавления пролиферации (ответ на LPS) и дифференцировки В-лимфоцитов.

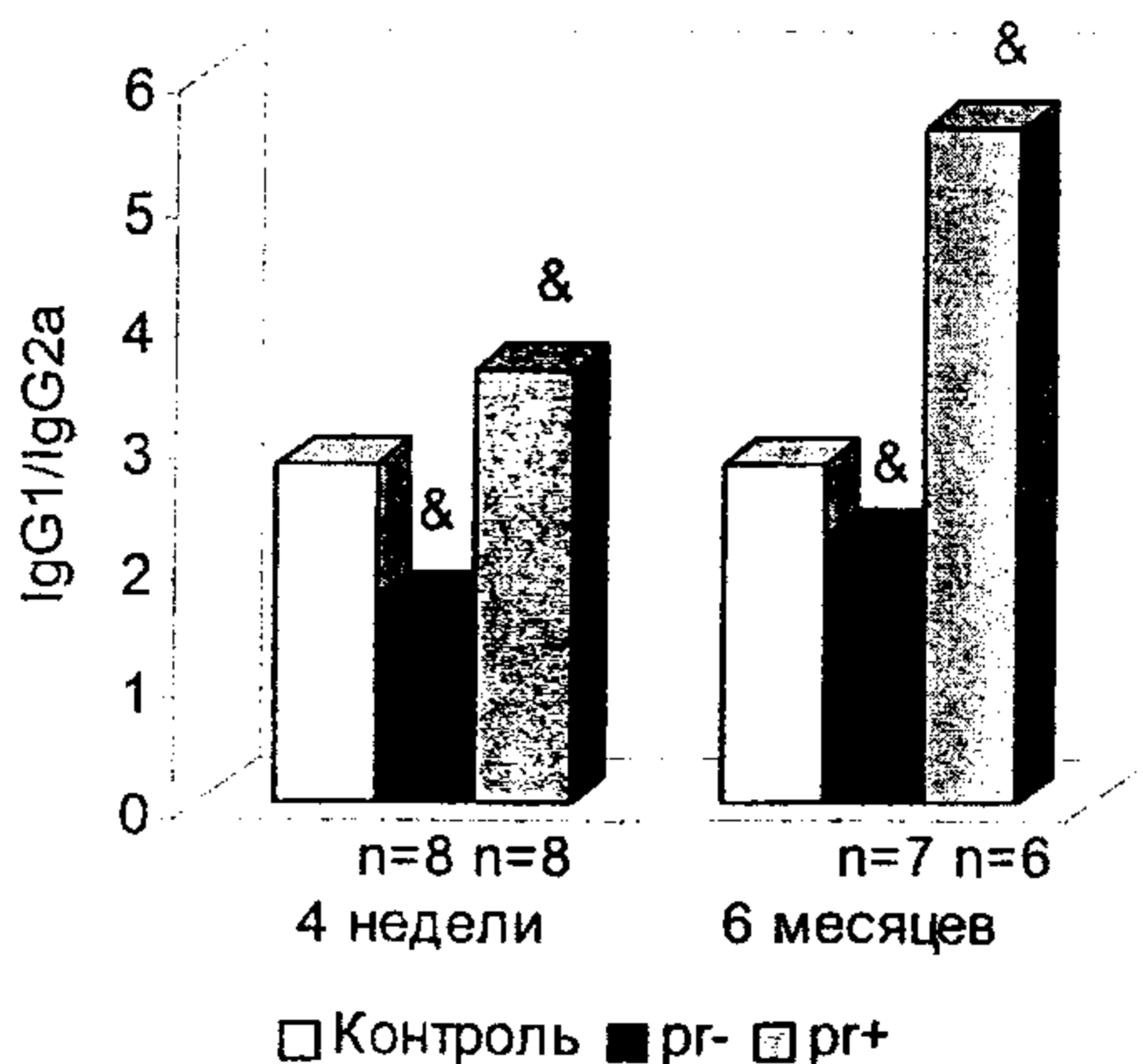
В настоящее время показано, что при переносе гибридам BDF лимфоидных клеток C57BL/6 или DBA/2 несмотря на развитие соответственно острой или хронической РТПХ в обоих случаях реакция начинается с распознавания CD4⁺ клетками донора аллоантигенов хозяина, продукции IL-2 и возрастания уровня цитокинов, свойственных Th2 (IL-4 и IL-10), что приводит к активации В-лимфоцитов (Via C. S., 1991; Rus V et al., 1995). Последующее расхождение двух типов РТПХ сопровождается в случае острой реакции экспансией CD8⁺ клеток донора, направленных против аллоантигенов хозяина и стимулирующих CD4⁺ донорского происхождения к синтезу IFN- γ . Активация CD8⁺ клеток донора в дальнейшем приводит к стимуляции цитотоксических лимфоцитов, что ограничивает гиперактивацию В лимфоцитов реципиента. Заканчивается острая РТПХ характерной картиной: лимфопения, атрофия тимуса, глубокая иммунодепрессия вследствие деструкции лимфоидной ткани хозяина. Недостаточная активность CD8⁺ лимфоцитов вызывает менее выраженные проявления острой РТПХ и даже её переход в хроническую форму (Tschetter J. R. et al., 2000). При развитии реакции по хроническому типу не происходит достаточного образования цитотоксических CD8⁺ клеток, специфичных к аллоантигенам хозяина, и ограничения поликлональной активации В лимфоцитов реципиента, что приводит к гипергаммаглобулинемии, образованию аутоантител и развитию аутоиммунной патологии. Таким образом, развитие острой формы РТПХ связано с переключением активированных донорских клеток на Th1-тип ответа, тогда как хроническая РТПХ связана со стимуляцией Th2-донорских клеток и сопровождается лимфопролиферативными процессами, в основном, со стороны В-лимфоцитов хозяина (Williamson E. et al., 1996).

Перенос мышам B6D2F1 лимфоидных клеток мышей DBA/2 индуцирует хроническую РТПХ, что обусловлено свойственным этой родительской линии низким числом прекурсоров цитотоксических CD8⁺ клеток (Via C. S. et al. 1991; Rus V. Et al. 2000). Несмотря на использование генетически однородных реципиентов и стандартные условия переноса, в наших опытах формируются два варианта иммунопатологического состояния, только один из которых сопровождается развитием аутоиммунного гломерулонефрита (группа rg+). Хотя оба варианта могут быть отнесены к хроническому типу, о чём свидетельствуют увеличение количества клеток в селезёнке, гипергаммаглобулинемия и отсутствие выраженной атрофии тимуса,

выявляются чёткие различия иммунных нарушений. Так, у всех реципиентов значительно подавлен гуморальный иммунный ответ на Т-зависимый антиген; в группе (pr+) к тому же наблюдается снижение клеточного ответа, тогда как у животных другой группы (pr-) - нормальный уровень клеточного ответа. Обнаруженное различие клеточного иммунитета между группами (pr+) и (pr-) подтверждается *in vivo* и *in vitro*: развитие у мышей аутоиммунного гломерулонефрита сопровождается снижением клеточного иммунного ответа на ЭБ (реакция ГЗТ), ингибцией пролиферативного ответа спленоцитов на Т-клеточные митогены и аллоантиген. Подавление клеточных реакций только в группе мышей pr+ позволило предположить, что в опытных группах активируются разные субпопуляции Th-клеток – Th1 в группе pr- и Th2 в группе pr+.

Определение подклассов иммуноглобулинов IgG₁/IgG_{2a} в сыворотке крови мышей реципиентов. В пользу этого предположения свидетельствует изменение соотношения подклассов иммуноглобулинов в опытных группах: определение соотношения подклассов иммуноглобулинов IgG₁/IgG_{2a} выявило снижение в группе (pr-) и подъём в группе (pr+); различия между двумя опытными группами усугубляются с течением времени (рис. 5). Соотношение IgG₁/IgG_{2a} является интегральным показателем преобладающей активности Th1 или Th2: Th1 стимулируют продукцию IgG_{2a}, Th2 индуцируют синтез IgG₁ (Shapper С. М., 1987). Таким образом, мыши pr- с более низким соотношением IgG₁/IgG_{2a} характеризуются сдвигом соотношения в сторону Th1, тогда как у мышей pr+ с преимущественным содержанием IgG₁, по-видимому, более активны Th2.

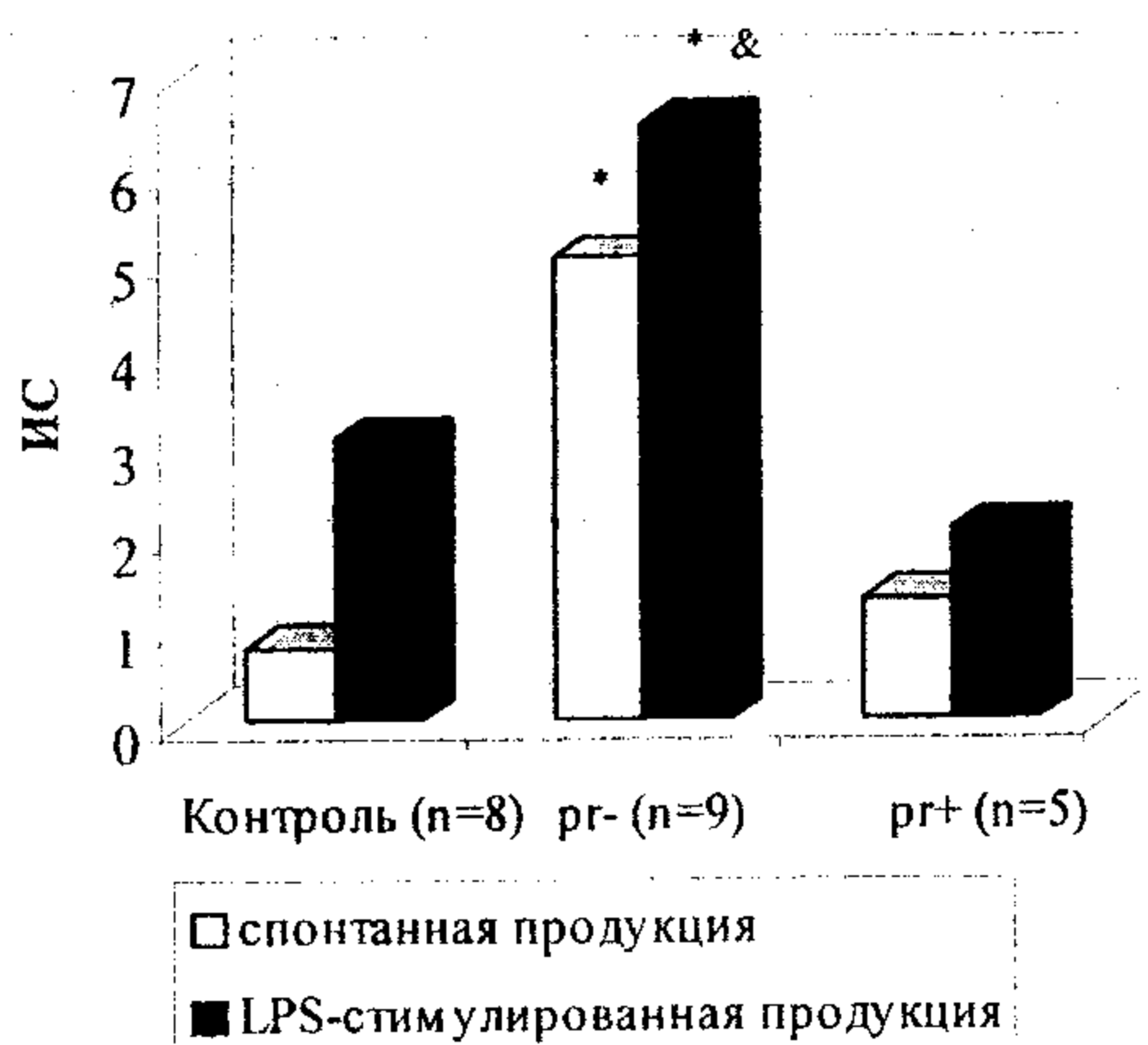
Рисунок 5. Соотношение подклассов иммуноглобулинов IgG₁/IgG_{2a} в сыворотке крови мышей В6D2F1 после индукции хронической РТПХ.



Механизмы развития у генетически однородных реципиентов разных вариантов хронической РТПХ.

Спонтанная и LPS стимулированная продукция IL-1. Для выяснения возможных механизмов, приводящих к изменению баланса Th1/Th2, изучали продукцию IL-1, играющего важную регулируемую роль в динамике развития РТПХ (Abhyankar S. et al., 1993). В наших опытах уровень продукции IL-1 в начальные сроки (через 1-3 месяца) после индукции хронической РТПХ при развитии аутоиммунного гломерулонефрита не отличается от контроля, тогда как у животных без протеинурии отмечается повышение спонтанной и LPS - стимулированной продукции IL-1 (рис. 6).

Рисунок 6. Спонтанная и LPS- стимулированная продукция IL-1 макрофагами мышей B6D2F1 после индукции хронической РТПХ.



Провоспалительные цитокины, в частности IL-1 и TNF- α , играют важную роль в развитии острой, Th1-зависимой РТПХ (Pape K. A. et al., 1997; Schmitz J. et al., 1993; Shibuya K. et al., 1998). Особенно резко в динамике Th1-зависимой РТПХ увеличивается продукция IL-1; введение растворимых IL-1R или антагонистов IL-1R снижает тяжесть течения трансплантационной болезни (Abhyankar S. et al., 1993; Deeg H. J. et al., 1993; Vogelsang G. B. et al., 1993). Кроме того, для IFN- γ - опосредованной ингибиции Th2 также необходимо присутствие IL-1 (Oriss T. B. et al., 1997). Таким образом, увеличение на ранних сроках у реципиентов уровня IL-1, вероятно, способствует как стимуляции Th1, так и подавлению Th2-клеток и, как следствие, тормозит поликлональную активацию В-лимфоцитов и развитие аутоиммунного гломерулонефрита (Schmitz J. et al., 1993; Pape K. A. et al., 1997; Shibuya K. et al., 1998).

Изучение гормонального статуса реципиентов с разными вариантами хронической РТПХ.

Известно, что Т-хелперы 1 и 2 типа обладают разной чувствительностью ко многим регуляторным факторам организма (кортикостероиды, норадреналин, простагландины и др.) (Daynes R.A. et al., 1989; Betz M., 1991; Mason D., 1991). Возможно, отличие в уровне таких биологически активных веществ в организме реципиентов при индукции РТПХ приводит к преимущественной активации разных субпопуляций Т хелперов, что может направлять течение хронической РТПХ по двум направлениям в зависимости от преобладающего соотношения Th1/Th2 в ключевой момент развития реакции. В частности, кортикостерон и прогестерон активируют Th2-клетки, которые в использованной модели обуславливают развитие аутоиммунного гломерулонефрита (Conkad D.M et al., 1990; Betz M., 1991; Almawi W.Y. et al., 1999; Kohm A.P. et al., 1999, 2000). В связи с этим представляло интерес изучить гормональный статус реципиентов.

1. *Определение фаз полового цикла у мышей реципиентов по влагалищным мазкам.* Для характеристики уровня половых гормонов определяли фазы полового цикла по влагалищным мазкам у мышей реципиентов при индукции хронической РТПХ во время первого и второго переноса донорских клеток. В эстральном цикле мышей выделяют четыре фазы (проэструс, эструс, метаэструс и диэструс), которые характеризуются разным уровнем половых гормонов. В течение полового цикла у мышей наблюдаются два пика прогестерона: один в метаэструсе и второй, более значительный, перед овуляцией – в проэструсе; в эту же фазу наблюдается подъём уровня эстрадиола. Кроме того, выявлены циклические колебания содержания кортикостероидов в периферической крови с максимальным уровнем также в фазе проэструса (Журавлёва Т.Б. и др., 1976). При анализе частоты распределения реципиентов по фазам полового цикла не обнаружилось достоверных различий между группами, хотя число мышей, впоследствии попадающих в группу rg^+ , в проэструсе оказывается несколько выше, чем мышей rg^- (соответственно 14% и 5%), тогда как для диэструса, когда концентрация эстрадиола и прогестерона минимальны, характерна обратная закономерность: соответственно 14,5% и 24,3%. Во время второго переноса ни одна мышь из группы rg^- не находилась в проэструсе, когда уровни прогестерона, эстрадиола и кортикостерона максимальны; других чётких различий по частоте распределения реципиентов по фазам полового цикла не обнаружилось. Возможно, фазы полового цикла у экспериментальных мышей не достаточно чётко определяются выбранным методом из-за резкого укорочения их продолжительности в связи с лабораторными условиями содержания животных (Журавлёва Т.Б. и др., 1976).

2. *Определение содержания кортикостерона в сыворотке крови мышей реципиентов при индукции хронической РТПХ.* Определение

содержания кортикостерона в сыворотке крови мышей - реципиентов показало, что исходный уровень кортикостерона одинаков в обеих группах; при развитии заболевания у животных, которые в дальнейшем попадали в группу rg^+ , концентрация кортикостерона в сыворотке крови была несколько выше (20,7 мкг% по сравнению с 14,8 мкг% в группе rg^-), но разница между группами не

достоверна. Не выявлено достоверной корреляции между уровнем развивающейся впоследствии протеинурии и концентрацией кортикостерона в сыворотке крови опытных мышей при индукции РТПХ ($r=0,54$, $p>0.05$).

3. Морфологическое исследование надпочечников и тимуса мышей с хронической РТПХ. Морфологическое изучение надпочечников и тимуса проводили в период выраженных клинических проявлений - через 6 месяцев после индукции РТПХ. В группе мышей $rg+$ наблюдается достоверное уменьшение пучковой и сетчатой зон надпочечников, что может свидетельствовать об их истощении вследствие предшествующей повышенной секреции глюкокортикоидных и половых гормонов. Кроме того, морфометрическое исследование тимуса показало достоверное снижение относительного объема коркового вещества у мышей $rg+$ по сравнению с мышами $rg-$, что отмечается при повышенном уровне кортикостерона (Kornbluth M. et al., 1991; You-Ten K.E. et al., 1995). Таким образом, по-видимому, развитие аутоиммунного гломерулонефрита сопровождается повышенным уровнем глюкокортикоидных и половых гормонов.

Показано, что в начальные моменты индукции как острой, так и хронической РТПХ отмечаются признаки активации Th2, преимущественная стимуляция Th1 или Th2 наступает позже (De Wit et al., 1993; Garside P. et al., 1994; Rus V. et al., 1995; You-Ten K.E. et al., 1995). По-видимому, и в изучаемой нами модели активация Th разного класса начинает проявляться не с момента индукции РТПХ, а спустя некоторое время и поддерживается в дальнейшем необходимым гормональным фоном – повышенным уровнем кортикостерона и эстрогенов, что находит отражение в полученных нами результатах: различия в продукции гормонов слабо выражены на ранних стадиях реакции и усиливаются в дальнейшем.

Модуляция развития Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояний.

Известно, что аутоиммунные процессы могут быть опосредованы T-клетками или антителами; не всегда и те, и другие приводят к повреждению клеток-мишеней, то есть к клиническим проявлениям. Переключение деструктивной аутоиммунной T-клеточной реакции на гуморальный ответ приводит к появлению циркулирующих аутоантител и отменяет повреждающее действие аутоагрессивных T-клеток, ослабляя проявления аутоиммунного заболевания. Аутоиммунные заболевания являются преимущественно Th1- или Th2-зависимыми; изменение баланса Th1/Th2 приводит к обострению или ремиссии болезни (Charlton B., Lafferty K.J., 1995; Козлов В.А., 1997).

1. Воздействия, сдвигающие баланс Th1/Th2 клеток в сторону преобладания Th1. Для изменения соотношения Th1/Th2 в сторону Th1 использовали введение плазмиды pUC19, обладающей способностью стимулировать продукцию IL-12 (Carson D. A. et al., 1997; Krieg A. M. 1999). Плазмиду pUC19 вводили в момент индукции хронической РТПХ внутривенно двукратно в дозе 50-100 μ кг/мышь. В качестве контроля использовали введение ДНК из тимуса телёнка. В опытных группах (введение плазмиды

pUC19 реципиенту или донору) отмечается значительное снижение частоты развития гломерулонефрита (рис. 7).

2. Воздействия, сдвигающие баланс Th1/Th2 клеток в сторону преобладания Th2.

Для стимуляции Th2 использовали введение адьюванта Фрейнда (полного и неполного) (Victoratos P. et al., 1997). Адьювант вводили внутривнутрибрюшинно многократно в период индукции хронической РТПХ в дозе 125 мкл/мышь. Контрольным мышам вводили раствор Хенкса в том же объёме.

Рисунок 7. Влияние введения плазмиды pUC19 на частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита у мышей B6D2F1 с хронической РТПХ.

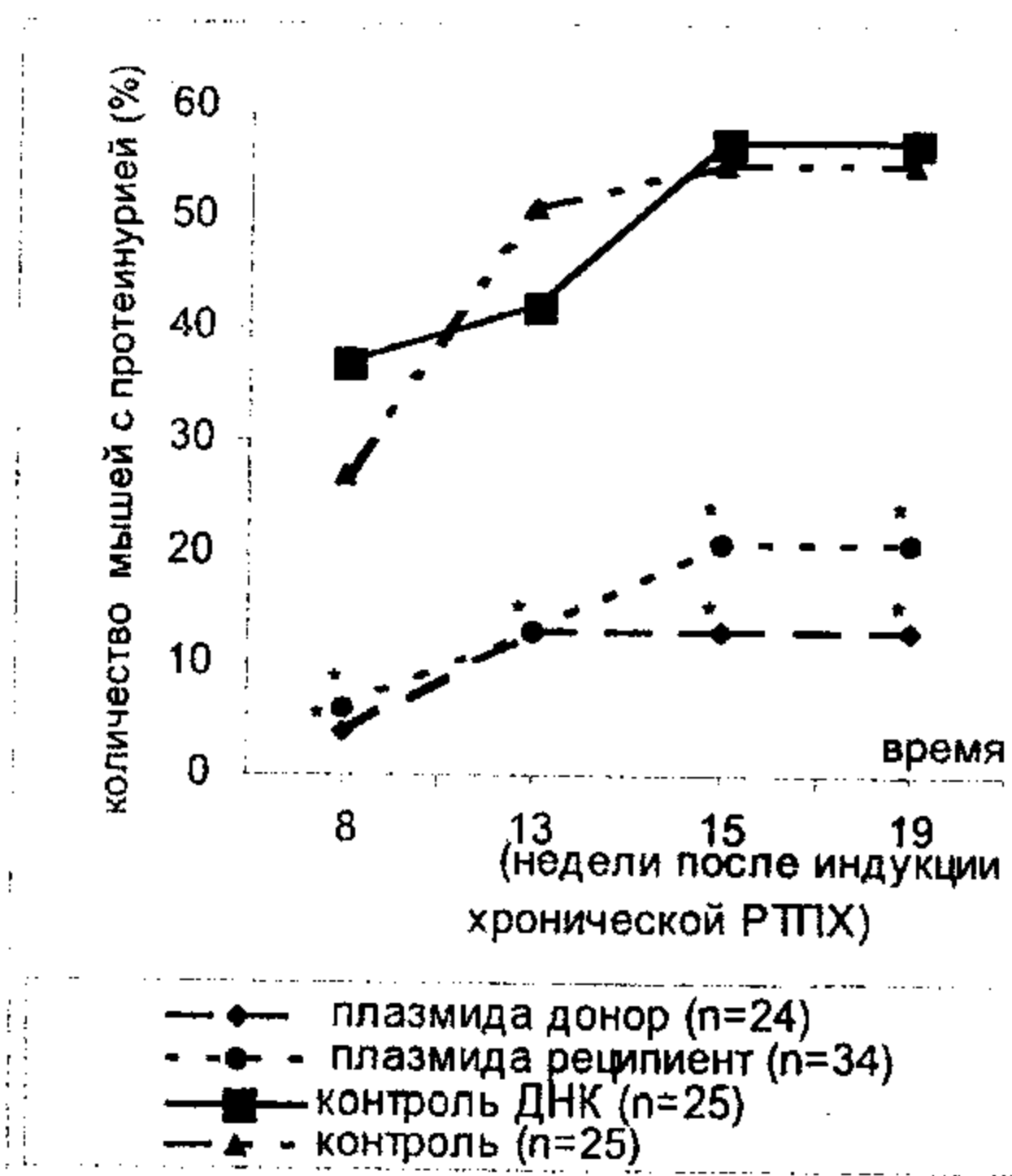
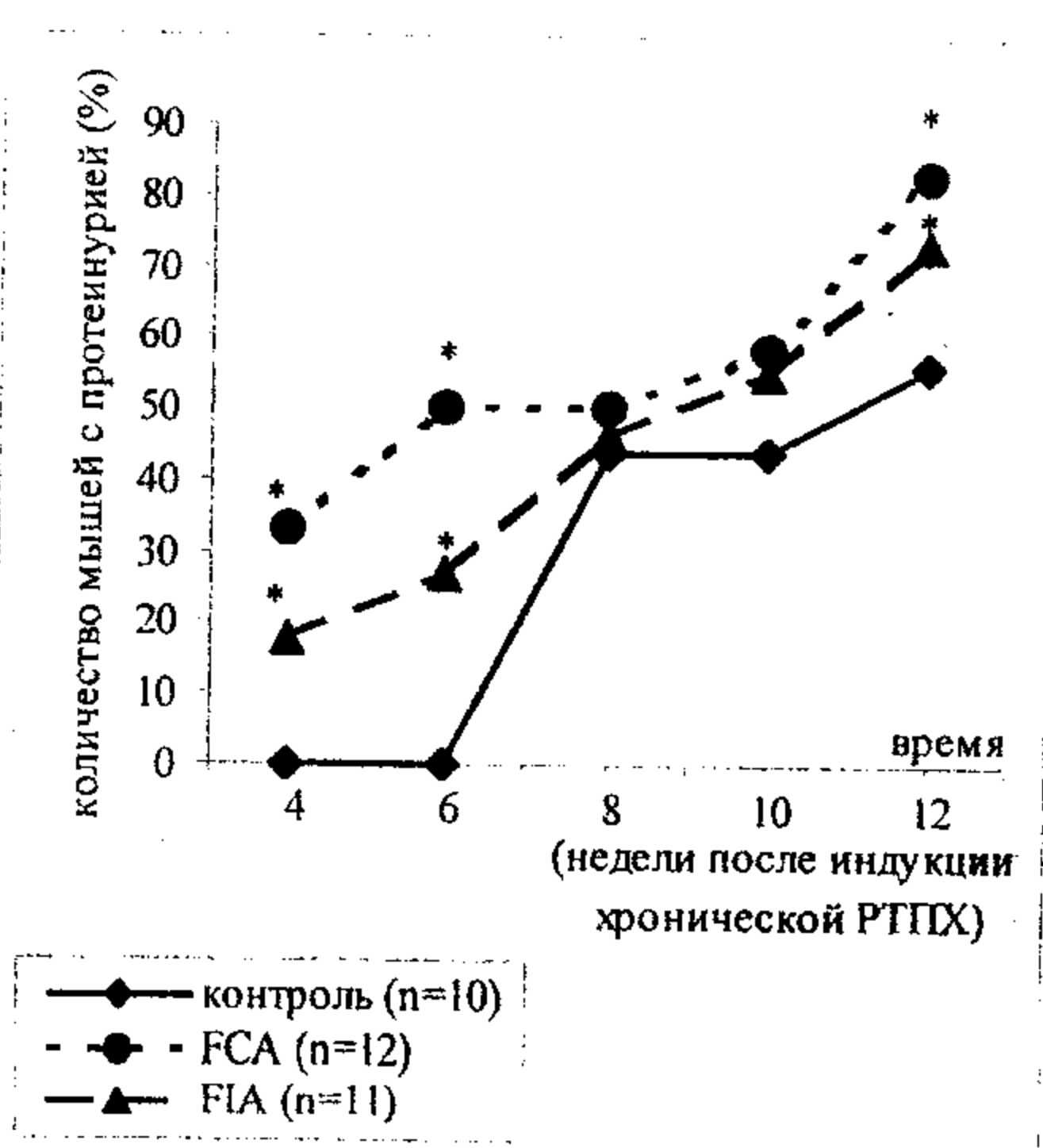


Рисунок 8. Влияние введения адьюванта Фрейнда на частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита у мышей B6D2F1 с хронической РТПХ.



В литературе имеются данные о стимуляции полным адьювантом Фрейнда (FCA) Th1-клеток, а неполным адьювантом Фрейнда (FIA) – Th2-клеток (Yip H.C. et al., 1999). Однако в большинстве работ отмечается активация Th2-клеток на фоне введения как FCA, так и FIA, что определялось по усилению гуморального иммунного ответа, преимущественной продукции иммуноглобулинов IgG1 подкласса, а также экспрессии спленоцитами генов цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 (Karagouni E.E., Hadjipetrou-Kourounakis L., 1990; Robinson K. et al., 1994; Victoratos P. et al., 1997; Faguim-Mauro E.L., Macedo M.S., 2000).

В наших опытах введение адьюванта Фрейнда приводит к более раннему развитию аутоиммунного гломерулонефрита и увеличивает число мышей с протеинурией (рис. 8), при этом течение заболевания имеет более тяжёлый характер и часто сопровождается развитием асцита (40% и 13% на фоне введения FCA и FIA по сравнению с 0% при хронической РТПХ без адьюванта).

ВЫВОДЫ.

1. Реакция трансплантат против хозяина в полуаллогенной системе DBA/2->B6D2F1 протекает по хроническому типу, о чём свидетельствуют увеличение количества клеток в селезёнке и гипергаммаглобулинемия на фоне отсутствия выраженной атрофии тимуса.
2. Индукция хронической реакции трансплантат против хозяина у генетически однородных реципиентов в полуаллогенной системе DBA/2->B6D2F1 приводит к развитию Th1- или Th2-зависимых иммунопатологических состояний, при этом в последнем случае формируется аутоиммунный гломерулонефрит.
3. Развитие Th1- или Th2-зависимых иммунопатологических состояний характеризуется разными нарушениями иммунитета: Th1-зависимая иммунопатология сопровождается глубокой депрессией гуморального иммунного ответа на Т-зависимый антиген; Th2-зависимая иммунопатология характеризуется подавлением гуморального и клеточного ответа на Т-зависимый антиген, снижением функциональной активности Т клеток.
4. Индукция хронической РТПХ приводит к изменению соотношения подклассов IgG в периферической крови: при Th1-зависимом варианте иммунопатологического состояния соотношение IgG_1/IgG_{2a} сдвигается в сторону IgG_{2a} , а при Th2-зависимом варианте – в сторону IgG_1 , что подтверждает преимущественную активацию Th1 или Th2-клеток.
5. Формирование иммунопатологии Th1-типа сопровождается высоким уровнем IL-1 в начальные сроки после индукции реакции. Развитие иммунопатологии Th2-типа характеризуется повышенной продукцией глюкокортикоидных и половых гормонов надпочечниками в период выраженных клинических проявлений.
6. Воздействия, влияющие на активность Th1 или Th2 клеток, изменяют течение реакции: введение плазмиды pUC19, активирующей Th1, уменьшает, а введение адьюванта Фрейнда, стимулирующего Th2, увеличивает частоту развития и клинические проявления аутоиммунного гломерулонефрита.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Сафронова И.В. Варианты иммунодефицита, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина (GVH). Ланималогия.- 1993. - N 1. - с. 69.
2. Сафронова И.В. Характеристика В-клеточного звена иммунитета при хронической реакции трансплантат против хозяина. Научный отчёт ИКИ СО РАМН 1993. – Новосибирск, 1994. - с. 85.
3. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Тузова М.Н., Сафронова И.В., Мирскова А.Н., Левковская Г.Г., Козлов В.А. К вопросу о механизмах иммуномодулирующего эффекта производных алканкарбоновых кислот. Иммунология. – 1994. - N 5. - с. 30-33.
4. Сафронова И.В. Характеристика иммунного статуса мышей при хронической реакции «трансплантат против хозяина». Сборник трудов молодых учёных СО РАМН.- Новосибирск, 1994. - с. 58-61.

5. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Тузова М.Н., Сафронова И.В., Мирскова А.Н., Левковская Г.Г., Козлов В.А. Механизмы иммуномодулирующего эффекта германийорганических соединений. Иммунология – 1995. - N 1. - с.27-31.
6. Kudaeva O., Saphronova I., Tuzova M. The development of immunodeficiency or autoimmune pathology in mice with graft-versus-host reaction. Scandinavian Journal of Immunology. – 1996. - Volume 43. - N 6. – p. 716.
7. Сафронова И.В., Козлов В.А. Варианты иммунопатологических состояний, индуцированных хронической реакцией GvH. Научный отчёт ИКИ СО РАМН 1996. – Новосибирск, 1997. - с. 55.
8. Колесникова О.П., Тузова М.Н., Сафронова И.В., Кудаева О.Т., Козлов В.А. Изучение эффекта производных индолил 3 ацетата и германийорганических соединений на модели аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина. Иммунология. – 1996. - N 3. - с. 43-47.
9. Saphronova I., Kudaeva O., Kolesnikova O., Kozlov V.. The mechanism of development of autoimmune pathology using a model. Conference on Genetic aspects of autoimmune diseases 7-10 May 1998. Noordwijkerhout the Netherlands. - Abstract Book.- p.16.
10. Кудаева О.Т., Сафронова И.В., Колесникова О.П., Козлов В.А.. Развитие иммунных нарушений при интенсивных физических нагрузках. Russian journal of Immunology. – 1999. - Vol. 4. - Suppl. 1. - p. 35.
11. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Сухенко Т.Г., Сафронова И.В., Козлов В.А. РТПХ- индуцированные модели растройств иммунной системы – как экспериментальные модели патологии иммунной системы. Russian journal of Immunology. – 1999. - Vol. 4. - Suppl.1. - p. 135.
12. Сафронова И.В., Логинов В.А., Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. К механизму развития аутоиммунной патологии в экспериментальной модели. Russian journal of Immunology. – 1999. - Vol. 4. - Suppl.1. - p. 136.
13. Kozlov V.A., Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Saphronova I.V. The development of immunological disorders during exercise. Int. J. of Sports Med. – 2000. – Suppl. 1. – V. 21. – p. 79-80.
14. Сафронова И.В., Кудаева О.Т., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю., Колесникова О.П., Козлов В.А.. Модуляция развития иммунопатологического состояния. Научный отчёт ИКИ СО РАМН 1999. –Новосибирск. – 2000. – с. 38-39.
15. Сафронова И.В., Кудаева О.Т., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю., Колесникова О.П., Козлов В.А.. Модуляция развития иммунопатологического состояния. Материалы III съезда иммунологов и аллергологов СНГ (Сочи, Россия – 16-20 сентября 2000). Аллергология и иммунология. – 2000. - том 1. - N 2. - с. 118.
16. Козлов В. А., Кудаева О. Т., Колесникова О. П., Сафронова И. В., Лактионов П. П., Рыкова Е. Ю., Обухова Л. А. Th1- и Th2- зависимые варианты хронической реакции трансплантат против хозяина. Иммунология. – В печати.
17. Козлов В. А., Сафронова И. В., Кудаева О. Т., Колесникова О. П..Участие IL-1 в развитии Th1- и Th2 – зависимых вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина. Бюлл. эксп. биол. и мед. – В печати.

18. Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Sukhenko T.G., Tuzova M.N., Saphronova I.V.
The correction of combined immuno- and hemopoiesis disorders induced by GvH
reaction. Russian journal of Immunology. – В печати.

Саша

Подписано в печать 16.05.2001. Формат 84 x 60 x 1/16.
Бумага офсетная. Тираж 80 экз. Печ. л. 1,25.
Заказ № 305

Отпечатано в типографии
Новосибирского государственного технического университета
630092, г. Новосибирск, пр. К. Маркса, 20.