

УЧАСТИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 В РАЗВИТИИ Th1- И Th2-ЗАВИСИМЫХ ВАРИАНТОВ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ “ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА”

В.А.Козлов, И.В.Сафронова, О.Т.Кудаева, О.П.Колесникова

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Полуаллогенный перенос лимфоидных клеток родительской линии DBA/2 гибридам (C57Bl/6×DBA/2)_{F1} приводит к развитию у генетически однородных реципиентов двух вариантов хронической реакции “трансплантат против хозяина” с преобладающей активацией донорских Th1- или Th2-клеток [2]. В первом случае наблюдается глубокая иммунодепрессия гуморального иммунного ответа, во втором формируется аутоиммунная патология — люпусподобный нефрит — на фоне подавления как клеточного, так и гуморального ответа. Формирование вариантов хронической реакции “трансплантат против хозяина” характеризуется разными изменениями уровня интерлейкина-1.

Ключевые слова: хроническая реакция “трансплантат против хозяина”, интерлейкин-1, гломерулонефрит

Индукция хронической реакции “трансплантат против хозяина” (РТПХ) у мышей (C57Bl/6×DBA/2)_{F1} путем переноса лимфоидных клеток мышшей линии DBA/2 приводит к развитию у части реципиентов на фоне подавления клеточного и гуморального звеньев иммунитета аутоиммунного люпусподобного гломерулонефрита, тогда как у остальных наблюдается выраженное подавление гуморального иммунного ответа, не сопровождающееся снижением клеточного ответа и формированием аутоиммунной патологии [2]. Для выяснения механизмов, приводящих к возникновению разных иммунопатологических состояний, изучали продукцию интерлейкина-1 (ИЛ-1), играющего важную регулируемую роль в динамике развития РТПХ [5].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали мышшей-самок линии DBA/2 и (C57Bl/6×DBA/2)_{F1} в возрасте 2 мес, полученных из питомника “Столбовая” (Моск-

ва). Хроническую РТПХ вызывали переносом лимфоидных клеток мышшей линии DBA/2 (5×10^6 клеток лимфатических узлов, 15×10^6 тимоцитов и 30×10^6 спленоцитов) мышсам (C57Bl/6×DBA/2)_{F1} внутривенно двукратно с интервалом 5 сут [7]. Начиная с 6 нед после индукции РТПХ регистрировали развитие гломерулонефрита по появлению белка в моче и разделяли животных на две группы: со стойкой протеинурией и без протеинурии (содержание белка в моче на уровне контрольной группы). О развитии гломерулонефрита судили по стойкому (не менее 3 раз подряд при еженедельном тестировании) присутствию белка в моче в концентрации более 3 мг/мл (блок определяли калориметрически с красителем кумаси голубым с помощью «Titertec Multiskan», 570 нм; калибровочная кривая по БСА 100-1000 мкг/мл), что коррелирует с морфологическим подтверждением болезни [3]. Проллиферативный ответ спленоцитов на Т- и В-клеточные митогены (конканавалин А — Кон А, митоген лаконоса — PWM и липополисахариды — ЛПС) и аллоантигены тестировали по включению ³H-тимидина в культуре *in vitro* [4]. Индекс стимуляции (ИС) спленоцитов рассчитывали как отношение уровня митогениндуцированной пролифе-

Адрес для корреспонденции: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14. ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. iph@online.nsk.su. Сафронова И.В.

рации (имп/мин) к уровню спонтанной пролиферации.

Способность макрофагальных клеток синтезировать ИЛ-1 определяли по способности данного цитокина усиливать пролиферативный ответ тимоцитов на субоптимальную дозу митогена [10]. ИС тимоцитов рассчитывали как отношение пролиферативного ответа в культуре с супернатантом от макрофагов к таковому в культуре без супернатанта. Контрольной группой служили животные того же генотипа, пола и возраста, что и реципиенты. Для анализа полученных результатов, учитывая далекий от нормального характер распределения изучаемых признаков, использовали методы непараметрической статистики [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее нами показано, что животные, различающиеся по клиническим проявлениям РТПХ, демонстрируют и разную способность к иммунному ответу на Т-зависимый антиген: первичный гуморальный иммунный ответ (число IgM- и IgG-АОК в селезенке) оказывается подавленным у всех животных, но депрессия более выражена у мышей без протеинурии; клеточный ответ (реакция ГЗТ) снижается только в группе мышей с аутоиммунной патологией [2].

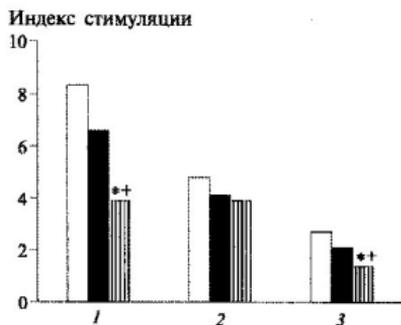


Рис. 1. Митогениндуцированная пролиферация клеток селезенки мышей (C57Bl/6 \times DBA/2) F_1 после индукции хронической реакции "трансплантат против хозяина".

1 — контроль ($n=17$), 2 — мыши без протеинурии ($n=19$), 3 — мыши со стойкой протеинурией ($n=11$).

Светлые столбики — конканавалин А (2 мкг/мл), темные — липополисахариды (15 мкг/мл), штриховка — митоген лактозиса (1 мкг/мл).

Здесь и на рис. 3 $p < 0.05$: * по сравнению с контролем, * по сравнению с группой без протеинурии.

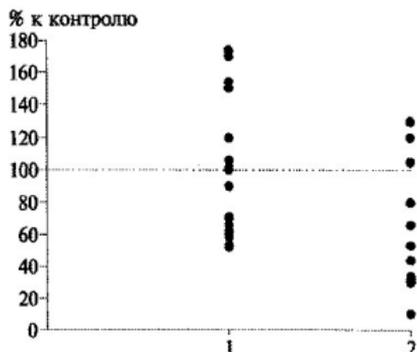


Рис. 2. Распределение индивидуальных показателей пролиферативного ответа на аллогенную стимуляцию спленоцитов мышей (C57Bl/6 \times DBA/2) F_1 после индукции хронической реакции "трансплантат против хозяина". 1 — группа без протеинурии ($n=19$), 2 — со стойкой протеинурией ($n=11$).

Изучение пролиферативного ответа клеток селезенки на Т- и В-клеточные митогены выявило достоверное снижение Кон А стимулированной пролиферации спленоцитов мышей с протеинурией по сравнению с мышами без протеинурии и контролем (рис. 1). Т-клеточные реакции оценивали также по ответу спленоцитов в смешанной культуре лимфоцитов (рис. 2). В группе без протеинурии пролиферативный ответ спленоцитов не отличался от такового в контроле (в среднем 98% от контроля), в то время как в группе животных с протеинурией отмечалось достоверное снижение ответа по сравнению как с мышами без протеинурии, так и с контрольными животными (64%, оба $p < 0.05$).

Таким образом, развитие у мышей аутоиммунного лупусоподобного гломерулонефрита сопровождается подавлением Т-клеточных реакций как *in vivo* [2], так и *in vitro*.

Через 1-3 мес после индукции хронической РТПХ у мышей без протеинурии отмечено достоверное ($p < 0.05$) повышение спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции ИЛ-1 по сравнению с интактными мышами, тогда как в группе животных с признаками аутоиммунной патологии показатели не отличались от контроля (рис. 3).

Известно, что ИЛ-1 необходим для пролиферации и активации Th1 [9,11,12]. Снижение уровня ИЛ-1 в группе с протеинурией в наших опытах сопровождалось подавлением Т-клеточных реакций. Провоспалительные цитокины, в частности ИЛ-1 и ФНО- α , играют важную роль

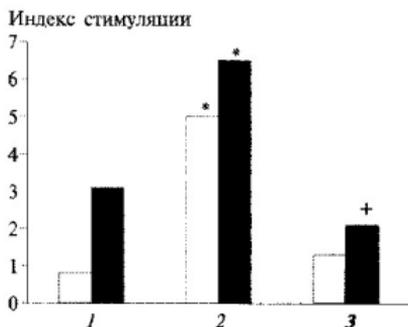


Рис. 3. Спонтанная (светлые столбики) и липополисахаридстимулированная (темные) продукция интерлейкина-1 макрофагами мышей (C57Bl/6 \times DBA/2)F₁ после индукции хронической реакции "трансплантат против хозяина". 1 — контроль (n=8), 2 — группа без протеинурии (n=9), 3 — со стойкой протеинурией (n=5).

в развитии острой Th1-зависимой РТПХ. Особенно резко в динамике РТПХ увеличивается продукция ИЛ-1; введение растворимых рецепторов ИЛ-1 или их антагонистов снижает тяжесть течения трансплантационной болезни [5,6,13]. Кроме того, для ингибции Th2, опосредованной интерфероном- γ , также необходимо присутствие ИЛ-1 [8]. Таким образом, повышение у реципиентов уровня ИЛ-1 на ранних сроках после трансплантации, вероятно, способствует как стимуляции Th1, так и подавлению Th2-клеток и, как следствие, тормозит по-

ликлональную пролиферацию В-лимфоцитов и развитие аутоиммунной патологии. Отсутствие повышения уровня ИЛ-1 приводит к снижению Т-клеточных реакций *in vivo* [2] и *in vitro*, изменению соотношения Th1/Th2 в пользу Th2, активации В-лимфоцитов хозяина и формированию лепусподобного нефрита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е.В. Выяслительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л., 1978.
2. Кудяева О.Т., Колесникова О.П., Сафронова И.В. // Ланималогия. 1993. № 1. С. 69.
3. Колесникова О.П., Кудяева О.Т., Логинов М.В. и др. // Вестн. АМН. 1991. № 2. С. 13-16.
4. Клауз Дж. Лимфоциты. Методы. М., 1990.
5. Abhyankar S., Gilliland D.G., Ferrara J.L. // Transplantation. 1993. Vol. 56, N 6. P. 1518-1523.
6. Deeg H.J. // Semin. Hematol. 1993. Vol. 30, Suppl. 4. P. 110-117.
7. Kimura M., Ida S., Shimada K., Kanai Y. // Clin. Exp. Immunol. 1987. Vol. 69, N 2. P. 385-393.
8. Oriss T.B., McCarthy S.A., Morel B.F. et al. // J. Immunol. 1997. Vol. 158, N 8. P. 3666-3672.
9. Pape K.A., Khoruts A., Mondino A., Jenkins M.K. // J. Immunol. 1997. Vol. 159, N 2. P. 591-598.
10. Phillips R., Rahson A.R. // J. Clin. Lab. Immunol. 1983. Vol. 11. P. 101-104.
11. Schmitz J., Assenmacher M., Radbruch A. // Eur. J. Immunol. 1993. Vol. 23, N 1. P. 191-199.
12. Shibuya K., Robinson D., Zonin F. et al. // J. Immunol. 1998. Vol. 160, N 4. P. 1708-1716.
13. Vogelsang G.B. // Curr. Opin. Oncol. 1993. Vol. 5, N 2. P. 276-281.

Получено 10.05.01

IMMUNOLOGY AND MICROBIOLOGY

Contribution of Interleukin-1 to Th1- and Th2-Dependent Variants of Chronic Graft-Versus-Host Reaction

V. A. Kozlov, I. V. Safronova, O. T. Kudaeva, and O. P. Kolesnikova

Translated from *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, Vol. 132, No. 8, pp. 185-187, August, 2001
Original article submitted May 10, 2001

Semiallogenic transfer of lymphoid cells from parental DBA/2 strain to (C57Bl/6×DBA/2) F_1 hybrids induces two variants of chronic graft-versus-host reaction with predominant activation of donor Th1 or Th2 cells [2] in genetically homologous recipients: first, severe inhibition of the humoral immune response, or second, autoimmune disease (lupus nephritis) against the background of suppressed cell and humoral immunity. These variants of chronic graft-versus-host reaction are characterized by different changes in interleukin-1 level.

Key Words: *chronic graft-versus-host reaction; interleukin-1; glomerulonephritis*

Induction of chronic graft-versus-host reaction (GVHR) in (C57Bl/6×DBA/2) F_1 mice by transfer of lymphoid cell from DBA/2 mice led to the development of autoimmune lupus nephritis against the background of suppressed cell and humoral immunity in some animals, while in others pronounced suppression of humoral immune response was not paralleled by suppression of cell response and the formation of autoimmune disease [2]. In order to elucidate the mechanisms leading to the development of different immunopathological states we studied production of interleukin-1 (IL-1) playing an important regulatory role in GVHR [5].

MATERIALS AND METHODS

Female DBA/2 and (C57Bl/6×DBA/2) F_1 mice aged 2 months (Stolbovaya Breeding Center, Moscow) were used. Chronic GVHR was induced by transfer of lymphoid cells from DBA/2 mice (5×10^6 lymph node cells, 15×10^6 thymocytes, and 30×10^6 splenocytes) to (C57Bl/6×DBA/2) F_1 mice. The cells were injected intravenously twice with a 5-day interval [7]. The de-

velopment of glomerulonephritis was monitored by urinary protein excretion starting from 6 weeks after GVHR induction. The animals were divided into 2 groups: with stable proteinuria and without proteinuria (urinary protein level as in the control group). Glomerulonephritis was diagnosed by the presence of at least 3 mg/ml protein in the urine (protein was measured colorimetrically on a Titertec Multiscan at 570 nm using Coumassi blue stain; BSA calibration curve 100-1000 μ g/ml), which correlated with morphological verification of the disease [3]. Proliferative response of splenocytes to T- and B-cell mitogens concanavalin A (ConA), pokeweed mitogen (PWM), lipopolysaccharide (LPS), and alloantigens was evaluated by 3 H-thymidin incorporation into cultured cells *in vitro* [4]. Splenocyte stimulation index (SI) was estimated as the ratio of mitogen-induced to spontaneous proliferation (cpm).

Production of IL-1 by macrophagal cells was evaluated by the capacity of this cytokine to stimulate thymocyte proliferation in response to suboptimal mitogen dose [10]. Thymocyte SI was estimated as the ratio of proliferative responses in the presence or absence of macrophages supernatant. Control group comprised sex- and age-matched animals of the same genotype as the recipients. The results were processed by the methods of nonparametric statistics [1].

Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk. **Address for correspondence:** iph@online.nsk.su. Safronova I.B.

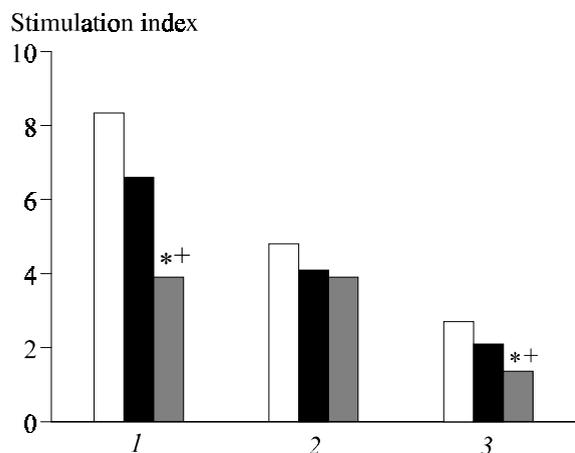


Fig. 1. Mitogen-induced proliferation of splenocytes of (C57Bl/6×DBA/2) F_1 mice after induction of chronic graft-versus-host reaction. 1) control ($n=17$); 2) mice without proteinuria ($n=19$); 3) mice with stable proteinuria ($n=11$). Light bars: concanavalin A (2 µg/ml); dark bars: lipopolysaccharide (15 µg/ml); shaded bars: pokeweed mitogen (1 µg/ml). Here and in Fig. 3 $p<0.05$: *compared to the control, +compared to mice without proteinuria.

RESULTS

We previously showed that animals differing by clinical manifestations of GVHR demonstrated different immune responses to T-dependent antigen: primary humoral immune response (number of IgM- and IgG-producing cells in the spleen) was suppressed in all animals, but this suppression was more pronounced in animals without proteinuria; cell immunity (DTH response) was decreased only in mice with autoimmune disease [2].

Evaluation of the splenocyte proliferation in response to T- and B-cell mitogens showed a significant decrease of ConA-stimulated proliferation of splenocytes in mice with proteinuria compared to mice without proteinuria and controls (Fig. 1). T cell reactions were evaluated by splenocyte response in mixed lymphocyte culture (Fig. 2). In animals without proteinuria, splenocyte proliferative response did not differ from the control (98% of control), while in animals with proteinuria the response was significantly decreased in comparison with animals without proteinuria and controls (64%, both $p<0.05$).

Hence, the development of autoimmune lupus glomerulonephritis in mice is associated with suppression of both *in vivo* [2] and *in vitro* T cell immunity.

One-three months after induction of chronic GVHR, the spontaneous and LPS-stimulated production of IL-1 in mice without proteinuria increased significantly ($p<0.05$) compared to intact mice, while in animals with signs of autoimmune disease these parameter did not differ from the control (Fig. 3).

Interleukin-1 is essential for proliferation and activation of Th1 [9,11,12]. Reduced content of IL-1 in

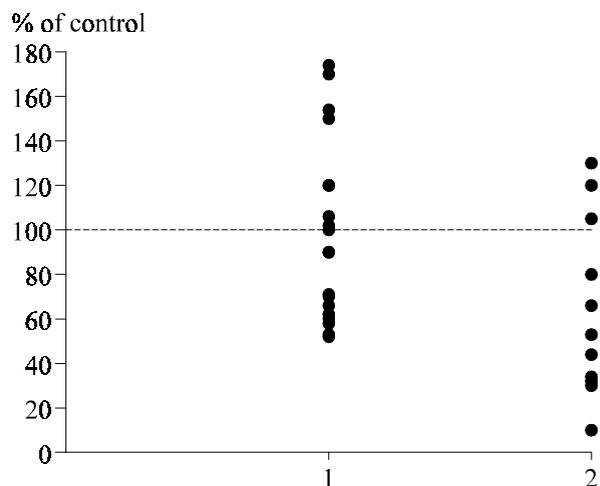


Fig. 2. Distribution of individual parameters of proliferative response to allogenic stimulation of splenocytes from (C57Bl/6×DBA/2) F_1 mice after induction of chronic graft-versus-host reaction. 1) mice without proteinuria ($n=19$); 2) mice with stable proteinuria ($n=11$).

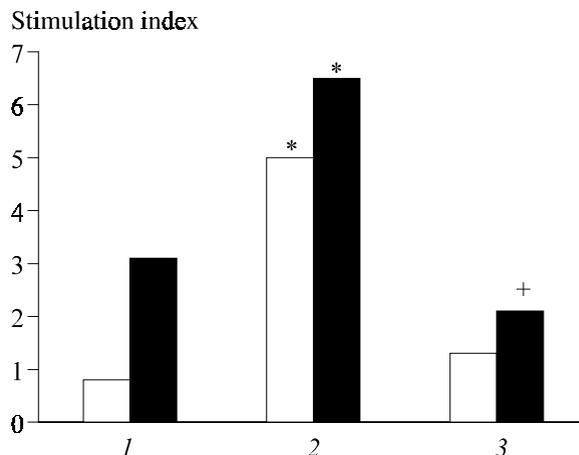


Fig. 3. Spontaneous (light bars) and lipopolysaccharide-stimulated (dark bars) production of interleukin-1 by macrophages of (C57Bl/6×DBA/2) F_1 mice after induction of chronic graft-versus-host reaction. 1) control ($n=8$); 2) mice without proteinuria ($n=9$); 3) mice with stable proteinuria ($n=5$).

mice with proteinuria was paralleled by suppression of T cell immunity. Proinflammatory cytokines IL-1 and TNF- α play an important role in the development of acute Th1-dependent GVHR. IL-1 production sharply increased in the course of GVHR; injection of soluble IL-1 receptors or their antagonists reduced the severity of transplantation disease [5,6,13]. Moreover, the presence of IL-1 is essential for inhibition of Th2 mediated by interferon- γ [8]. It can be hypothesized that enhanced production of IL-1 in recipients at early stages after transplantation promotes stimulation of Th1 and suppression of Th2 cells, thus inhibiting polyclonal proliferation of B-lymphocytes and development of autoimmune disease. If IL-1 production is not increased, T-cell reactions *in vivo* [2] and *in vitro* are decreased, the

Th1/Th2 ratio is shifted towards Th2, host B-lymphocytes are activated, and lupus nephritis develops.

REFERENCES

1. E. V. Gubler, *Computation Methods of Analysis and Recognition of Pathological Processes* [in Russian], Leningrad (1978).
 2. O. T. Kudaeva, O. P. Kolesnikova, and I. V. Safronova, *Lanomalogiya*, No. 1, 69 (1993).
 3. O. P. Kolesnikova, O. T. Kudaeva, M. V. Loginov, et al., *Vestn. Akad. Med. Nauk*, No. 2, 13-16 (1991).
 4. J. Klaus, *Lymphocytes. Methods* [in Russian], Moscow (1990).
 5. S. Abhyankar, D. G. Gilliland, and J. L. Ferrara, *Transplantation*, **56**, No. 6, 1518-1523 (1993).
 6. H. J. Deeg, *Semin. Hematol.*, **30**, Suppl. 4, 110-117 (1993).
 7. M. Kimura, S. Ida, K. Shimada, and Y. Kanai, *Clin. Exp. Immunol.*, **69**, No. 2, 385-393 (1987).
 8. T. B. Oriss, S. A. McCarthy, B. F. Morel, et al., *J. Immunol.*, **158**, No. 8, 3666-3672 (1997).
 9. K. A. Pape, A. Khoruts, A. Mondino, and M. K. Jenkins, *Ibid.*, **159**, No. 2, 591-598 (1997).
 10. R. Phillips and A. R. Rabson, *J. Clin. Lab. Immunol.*, **11**, 101-104 (1983).
 11. J. Schmitz, M. Assenmacher, and A. Radbruch, *Eur. J. Immunol.*, **23**, No. 1, 191-199 (1993).
 12. K. Shibuya, D. Robinson, F. Zonin, et al., *J. Immunol.*, **160**, No. 4, 1708-1716 (1998).
 13. G. B. Vogelsang, *Curr. Opin. Oncol.*, **5**, No. 2, 276-281 (1993).
-