

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ, ИЗМЕНЯЮЩИХ СООТНОШЕНИЕ Th1/Th2, НА ЧАСТОТУ РАЗВИТИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА

О.Т.Кудаева, Е.В.Гойман, А.П.Лыков, О.П.Колесникова, В.А.Козлов

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Индукция хронической реакции трансплантат против хозяина в полуаллогенной системе DBA/2→(DBA/2×C57Bl/6)F₁ приводит к развитию Th1- или Th2-зависимых вариантов иммунопатологических состояний. Изменение соотношения Th1/Th2 в момент индукции с помощью препаратов с разным механизмом действия на клетки иммунной системы, сдвигающих баланс Th1/Th2 в сторону Th2 (бисфенол А, пентоксифиллин, мурамилдипептид), приводит к увеличению у реципиентов частоты развития Th2-зависимого аутоиммунного люпусподобного гломерулонефрита.

Ключевые слова: хроническая реакция трансплантат против хозяина, Th1/Th2, бисфенол А, пентоксифиллин, мурамилдипептид

Перенос родительских лимфоидных клеток мышам-гибридам F₁ индуцирует реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ), течение которой может зависеть от многих факторов: различия донора и реципиента по главному комплексу гистосовместимости, количества и фенотипа перенесенных клеток и т.п. Так, при трансплантации 100×10⁶ клеток селезенки и лимфатических узлов внутривенно двукратно с интервалом в 5 дней в системе DBA/2→(DBA/2×C57Bl/6)F₁ у самок возникает хроническая РТПХ, сопровождающаяся аутоиммунным расстройством — люпусподобным гломерулонефритом [6].

Индукцируя хроническую РТПХ по описанной схеме, мы обнаружили, что, несмотря на генетическую однородность реципиентов (DBA/2×C57Bl/6)F₁, реакция может идти по двум направлениям: у части мышей развивается аутоиммунный гломерулонефрит (lupus⁺), как описано в литературе, а у остальных выраженное поражение почек отсутствует, но наблюдается глубокое подавление гуморального ответа на Т-зависимый антиген (lupus⁻). В первом случае реакция идет преимущественно по Th2-, а во втором — по Th1-пути [2].

Ранее нами было показано, что введение плазмиды, стимулирующей синтез ИЛ-12 в организме, в данной модели приводит к изменению соотношения lupus⁺/lupus⁻ мышей в пользу последних, направляя течение реакции по Th1-зависимому пути [1]. Аналогичные данные были получены на мышах (C57Bl/10×DBA/2)F₁ [11].

В данной работе изучалась возможность изменить течение реакции в сторону активации Th2-зависимых процессов. В качестве модуляторов использовались препараты с разным механизмом действия, сдвигающие соотношение Th1/Th2 в сторону Th2.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 2-4-месячных мышей-самок (C57Bl/6×DBA/2)F₁ и линии DBA/2, полученных из питомников "Рассвет" (Томск) и экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск). Мышей содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Хроническую РТПХ моделировали путем переноса мышам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Вводили клетки лимфатических узлов и селезенки, выделенных *ex tempore* в

стерильной среде RPMI-1640 (НПО "Вектор"). Каждая мышь-реципиент получала по 65×10^6 клеток путем внутривенной инъекции в объеме 0.5 мл среды двукратно с интервалом в 5 дней [6].

О развитии гломерулонефрита свидетельствовал стойкий белок в моче (более 3 мг/мл не менее 3 раз подряд при еженедельном тестировании), что коррелировало с морфологическим подтверждением болезни [3]. Частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита при индукции хронической РТПХ в полуаллогенной модели DBA/2 \rightarrow (DBA/2 \times C57Bl/6)F₁ пытались изменить, воздействуя на соотношение Th1/Th2 во время индукции. В качестве иммуномодулирующих препаратов использовали соединения, сдвигающие соотношение Th1/Th2 в сторону Th2-клеток, с разным механизмом действия: мурамилдипептид (MDP), бисфенол А, пентоксифиллин. Бисфенол А ("ICN") вводили в дозе 2.5 мкг/кг *per os* ежедневно в течение 2 нед. MDP ("ICN") животные получали в дозе 0.5 мг/кг или 1.0 мг/кг внутривенно двукратно с интервалом в 10 дней, пентоксифиллин ("Авентис Фарма Лтд.") — в дозе 1 мг/мышь *per os* ежедневно в течение 1 нед. Все препараты вводили только во время индукции реакции (1-я и 2-я неделя при трансплантации клеток). Результаты оценивали по изменению соотношения количества *lupus*⁺/*lupus*⁻ мышей в конце эксперимента через 3 мес после переноса полуаллогенных клеток.

Для статистического анализа результатов использовали методы непараметрической статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Th2-клетки играют центральную роль в патогенезе аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного хронической РТПХ [4,9]. Th1 и Th2 обладают разной чувствительностью ко многим регуляторным факторам организма (кортикостероиды, норадреналин, простагландины и др.) [8,5]. Разный уровень таких биологически активных веществ в организме реципиентов приводит к преимущественной стимуляции Т-хелперов разных классов и, как следствие, к разному соотношению цитокинов в организме, что может обуславливать особенности развития иммунного процесса.

MDP, дериват клеточной стенки бактерий, обладает адьювантным действием, вызывает поликлональную активацию В-клеток и усиливает стимулирующее влияние ИЛ-4 на активированные В-лимфоциты [12]. Введенный в дозе 0.5 мг/кг MDP увеличивал у мышей-реципиентов частоту развития гломерулонефрита до 75% по срав-

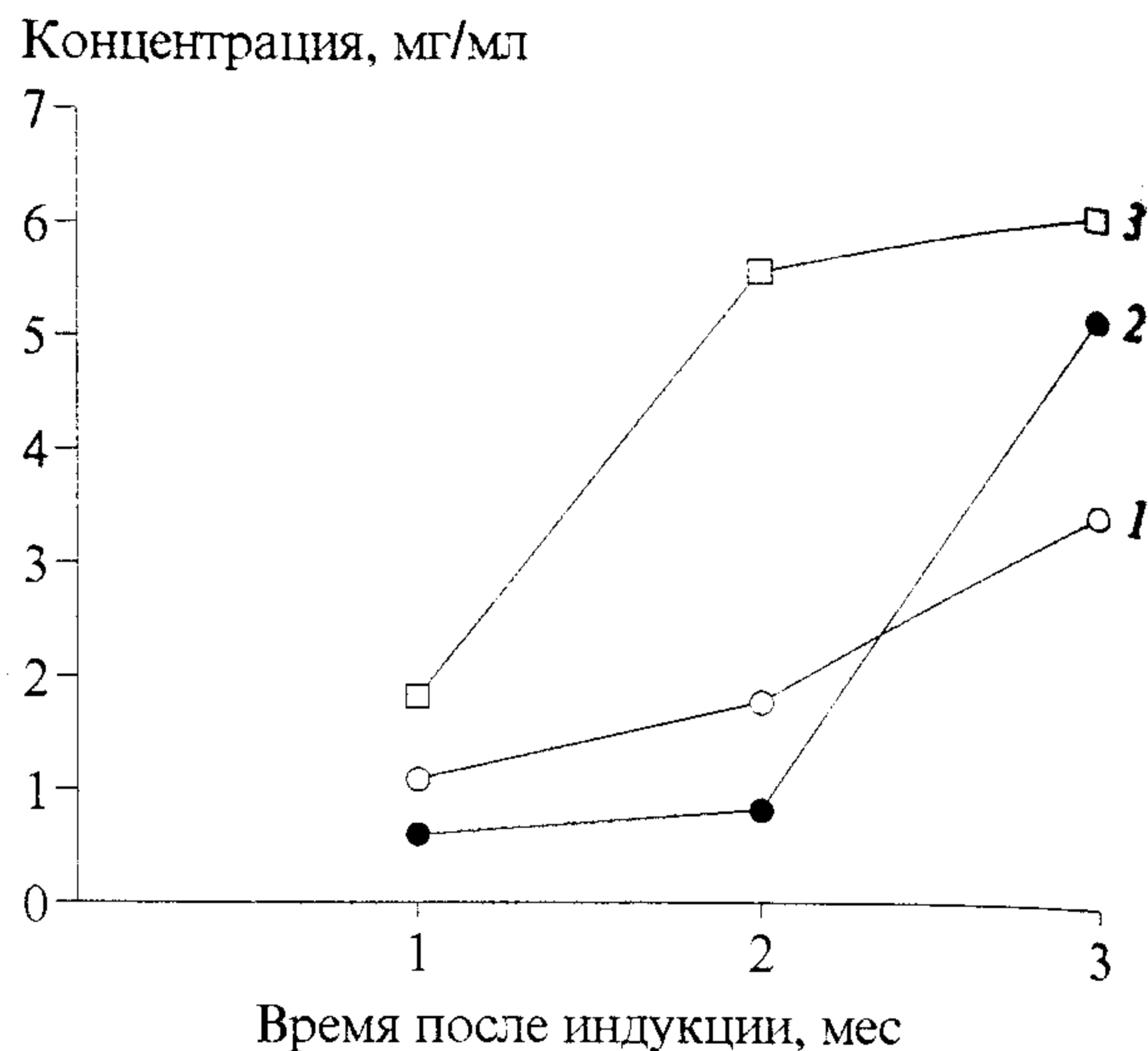


Рис. 1. Концентрация белка в моче у мышей B6D2F1 под влиянием разных доз мурамилдипептида (MDP) после индукции хронической реакции трансплантата против хозяина (РТПХ). 1 — хроническая РТПХ ($n=7$), 2 — хроническая РТПХ+MDP (0.5 мг/кг; $n=6$), 3 — хроническая РТПХ+MDP (1.0 мг/кг; $n=6$).

нению с 18% в контрольной группе ($p<0.05$). Увеличение дозы MDP до 1.0 мг/кг привело к более выраженному эффекту: частота гломерулонефрита возросла до 83.3% ($p<0.05$). Согласно наблюдениям за динамикой появления протеи-

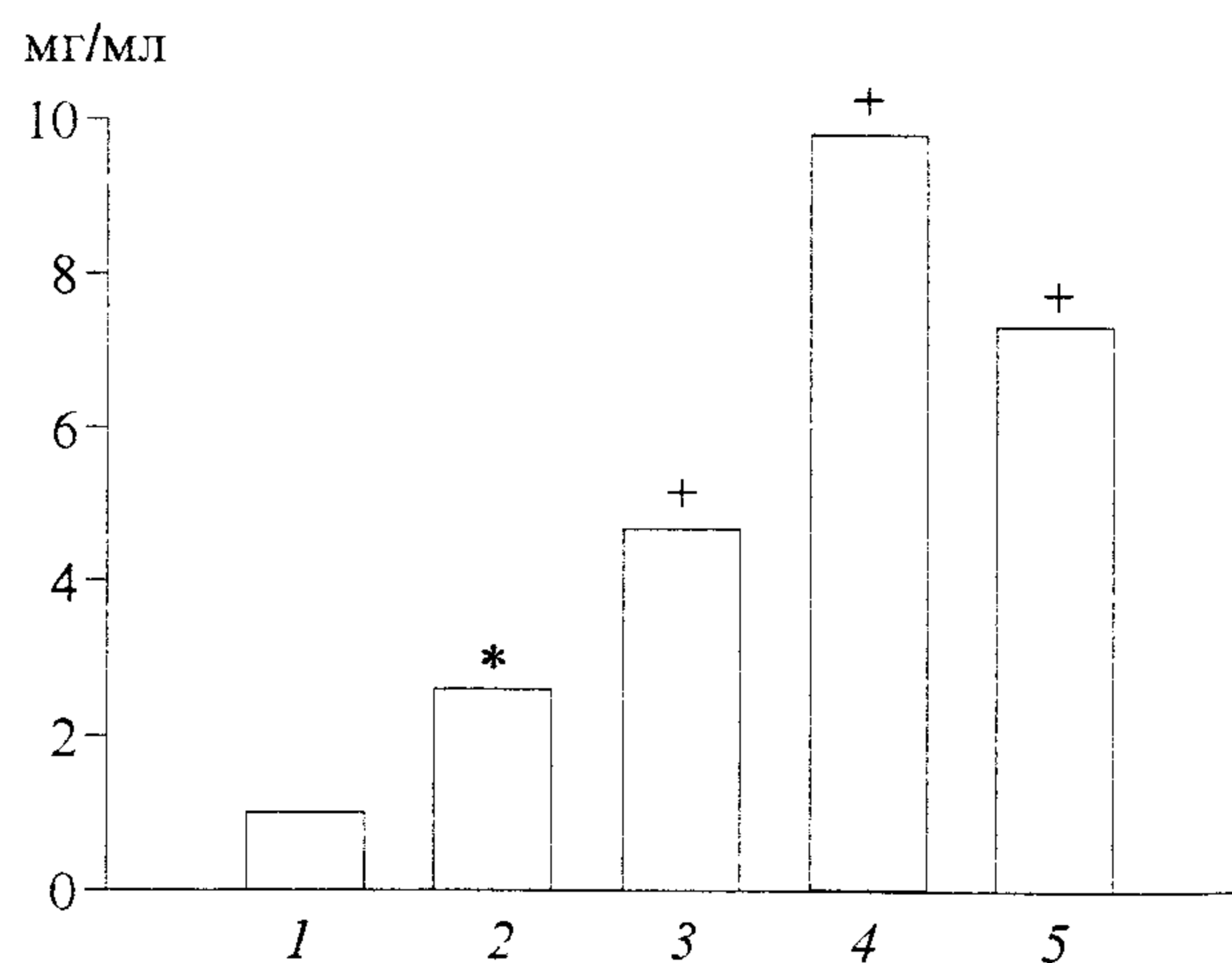


Рис. 2. Изменения уровня протеинурии у мышей B6D2F1 под влиянием разных препаратов через 3 мес после индукции хронической РТПХ. По оси ординат — концентрация белка в моче относительно интактного контроля. 1 — интактные мыши ($n=8$), 2 — хроническая РТПХ ($n=21$), 3 — хроническая РТПХ+бисфенол А ($n=11$), 4 — хроническая РТПХ+MDP (1.0 мг/кг; $n=6$), 5 — хроническая РТПХ+пентоксифиллин ($n=4$). $p<0.05$ по сравнению *с интактным контролем, +с хронической РТПХ.

нурии у мышей B6D2F1 после индукции хронической РТПХ на фоне введения разных доз MDP, при применении данного препарата в дозе 0.5 мг/кг развитие гломерулонефрита сначала задерживается, но в дальнейшем достигает значений, зарегистрированных при введении дозы 1.0 мг/кг (рис. 1).

Бисфенол А, широко используемый в промышленном производстве пластмасс, обладает способностью связываться с рецепторами к эстрогену, несмотря на структурные отличия с гормоном. При этом наблюдается снижение продукции ИФН- γ и синтеза IgG2a [10]. В наших экспериментах при введении низких доз бисфенола А (2.5 мкг/кг) *per os* мышам-реципиентам увеличивалась частота развития гломерулонефрита до 63.6% по сравнению с 33.3% в контрольной группе ($p < 0.05$).

Пентоксифиллин, лекарственный препарат, улучшающий микроциркуляцию и реологические свойства крови, обладает также иммуномодулирующими свойствами: ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов, в том числе ИФН- γ , и подавляет развитие Th1-зависимого экспериментального аллергического энцефаломиелита у мышей [7]. Введение пентоксифиллина мышам-реципиентам увеличивало частоту развития гломерулонефрита до 75% по сравнению с 25% в контрольной группе.

Под действием препаратов концентрация белка в моче возрастала (рис. 2), что свидетельствовало о развитии нефрита [3].

Таким образом, полученные данные подтверждают наше предположение о том, что выбор пути развития иммунопатологического процесса происходит на самых ранних этапах индукции хронической РТПХ и определяется соотношением Th1/Th2-клеток в этот период, когда внешним воздействием еще можно изменить направление процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власов В.В., Рыкова Е.Ю., Сафронова И.В. и др. // Докл. АН. 2002. Т. 382. С. 844-846.
2. Козлов В.А., Кудаева О.Т., Колесникова О.П. и др. // Иммунология. 2002. № 3. С. 143-146.
3. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Логинов М.В. и др. // Вестн. АМН. 1991. № 12. С. 13-16.
4. De Wit D.M., Van Mechelen M., Zanin C. et al. // J. Immunol. 1993. Vol. 150, N 2. P. 361-366.
5. Elenkov I.J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004. Vol. 1024. P. 138-146.
6. Kimura M., Shimada K., Kanai Y. // Clin. Exp. Immunol. 1987. Vol. 69, N 2. P. 385-393.
7. Okuda Y., Sakoda S. // Immunopharmacology. 1996. Vol. 35. P. 141-148.
8. Rook G.A.W., Hernandez-Pamdo R., Lightman S.L. // Immunol. Today. 1994. Vol. 15, N 7. P. 301-303.
9. Rus V., Svetic A., Nguyen P. et al. // J. Immunol. 1995. Vol. 155. P. 2396-2406.
10. Sawai C., Anderson K., Walser-Kuntz D. // Environ. Health Perspect. 2003. Vol. 111, N 16. P. 1883-1887.
11. Senuma A., Hagiwara E., Nagahama K. et al. // Cytokine. 2002. Vol. 20. P. 23-29.
12. Souvannavong V., Brown S., Adam A. // Cell Immunol. 1990. Vol. 126, N 1. P. 106-116.

Получено 13.05.05

Effects of Preparations Modifying Th1/Th2 Ratio on the Incidence of Clinical Variants of Chronic Graft-versus-Host Reaction

O. T. Kudaeva, E. V. Goiman, A. P. Lykov, O. P. Kolesnikova, and V. A. Kozlov

Translated from *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, Vol. 140, No. 9, pp. 325-327, September, 2005
Original article submitted May 13, 2005

Induction of chronic graft-versus-host reaction in a semiallogenic DBA/2→(DBA/2×C57Bl/6) F₁ system leads to the development of Th1- or Th2-dependent immunopathologies. Modification of the Th1/Th2 ratio during induction with preparations acting on the immune system cells via different mechanisms and shifting the Th1/Th2 balance towards Th2 (bisphenol A, pentoxifylline, muramyl dipeptide) increases the incidence of Th2-dependent autoimmune lupus-like glomerulonephritis.

Key Words: *chronic graft-versus-host reaction; Th1/Th2; bisphenol A; pentoxifylline; muramyl dipeptide*

Transplantation of parental lymphoid cells to F₁ hybrid mice induces graft-versus-host reaction (GVHR). The course of GVHR depends on many factors: differences between the donor and recipient by the main histocompatibility complex, number and phenotype of transplanted cells, *etc.* Intravenous transplantation of 100×10⁶ cells from the spleen and lymph nodes at 5-day interval in the DBA/2→(DBA/2×C57Bl/6)F₁ system induces the development of chronic GVHR paralleled by an autoimmune disorder (lupus-like glomerulonephritis) in females [6].

When inducing GVHR by the above scheme we found that, despite genetic homogeneity of (DBA/2×C57Bl/6)F₁ recipients, the reaction can develop by two pathways: some mice develop autoimmune glomerulonephritis (lupus⁺), as described previously, while in others humoral response to T-dependent antigen is deeply suppressed (lupus⁻) in the absence of renal involvement. In the former case the reaction runs mainly by the Th2 route, in the latter one by the Th1 route [2].

We previously showed that insertion of a plasmid stimulating IL-12 synthesis in the body modifies the ratio of lupus⁺/lupus⁻ mice towards the latter type, thus directing the reaction by the Th1-dependent route [1]. Similar data were obtained on (C57Bl/10×DBA/2) F₁ mice [11].

Here we studied the possibility of modifying the course of reaction towards activation of Th2-dependent processes. Preparations with different mechanism of action shifting the Th1/Th2 ratio towards Th2 were used as modifiers.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out on 2-4-month-old female (C57Bl/6×DBA/2)F₁ and DBA/2 mice from Rassvet Breeding Center (Tomsk) and Experimental Biological Clinic of Laboratory Animals, Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences (Novosibirsk). The mice were kept in accordance with the regulations adopted by the European Convention for Protection of Animals Used for Experimental and Other Research Purposes (Strasbourg, 1986). Chronic GVHR was modeled by transplanting lymphoid cells of parental DBA/2 strain to B6D2F1 mice. Lymph node and sple-

Institute of Clinical Immunology, Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk. **Address for correspondence:** olga_kudaeva@mail.ru. O. T. Kudaeva

nic cells isolated *ex tempore* in sterile RPMI-1640 (Vektor Firm) were transplanted. Each recipient mouse received two intravenous injections of 65×10^6 cells in 0.5 ml medium at 5-day interval [6].

The development of glomerulonephritis was seen from stable proteinuria (>3 mg/ml at least 3 times running at everyday testing), which correlated with morphological verification of disease [3]. We tried to change the incidence of autoimmune glomerulonephritis development during induction of chronic GVHR in a semiallogenic DBA/2 \rightarrow (DBA/2 \times C57Bl/6) F_1 model by modulating the Th1/Th2 ratio during induction. Compounds with different mechanisms of action shifting the Th1/Th2 ratio towards Th2 cells were used as immunomodulators: muramyl dipeptide (MDP), bisphenol A, and pentoxifylline. Bisphenol A (ICN) was given orally in a dose of 2.5 μ g/kg daily for 2 weeks. MDP (ICN) was injected intraperitoneally in doses of 0.5 or 1.0 mg/kg (twice at 10-day interval); pentoxifylline (Aventis Pharma Ltd.) was given orally in a daily dose of 1 mg for 1 week. All drugs were used only during the reaction induction (weeks 1 and 2 after cell transplantation). The results were evaluated by changes in the ratio of lupus⁺/lupus⁻ mice at the end of the experiment 3 months after semiallogenic cell transfer.

The results were statistically processed by non-parametric statistical methods.

RESULTS

Th2 cells play a central role in the pathogenesis of autoimmune glomerulonephritis induced by chronic GVHR [4,9]. Th1 and Th2 are characterized by different sensitivity to many regulatory factors (corticosteroids, norepinephrine, prostaglandins, etc.) [8,5]. Different levels of these bioactive substances in recipients leads to predominant stimulation of T-helpers of different classes and hence, to different ratio of cytokines in the body, which can result in different course of the immune process.

MDP, a bacterial cell wall derivative characterized by adjuvant effect, causes polyclonal activation of B-cells, and potentiates the stimulatory effect of IL-4 on activated B-lymphocytes [12]. MDP injected in a dose of 0.5 mg/kg increased the incidence of glomerulonephritis development in recipient mice to 75% vs. 18% in the control group ($p < 0.05$). MDP in a dose of 1.0 mg/kg produced a more pronounced effect: the incidence of glomerulonephritis increased to 83.3% ($p < 0.05$). The time course of proteinuria development in B6D2F1 mice after induction of chronic GVHR during treatment with MDP in different doses was different: during treatment with MDP in a dose of 0.5 mg/kg the development of glomerulonephritis was de-

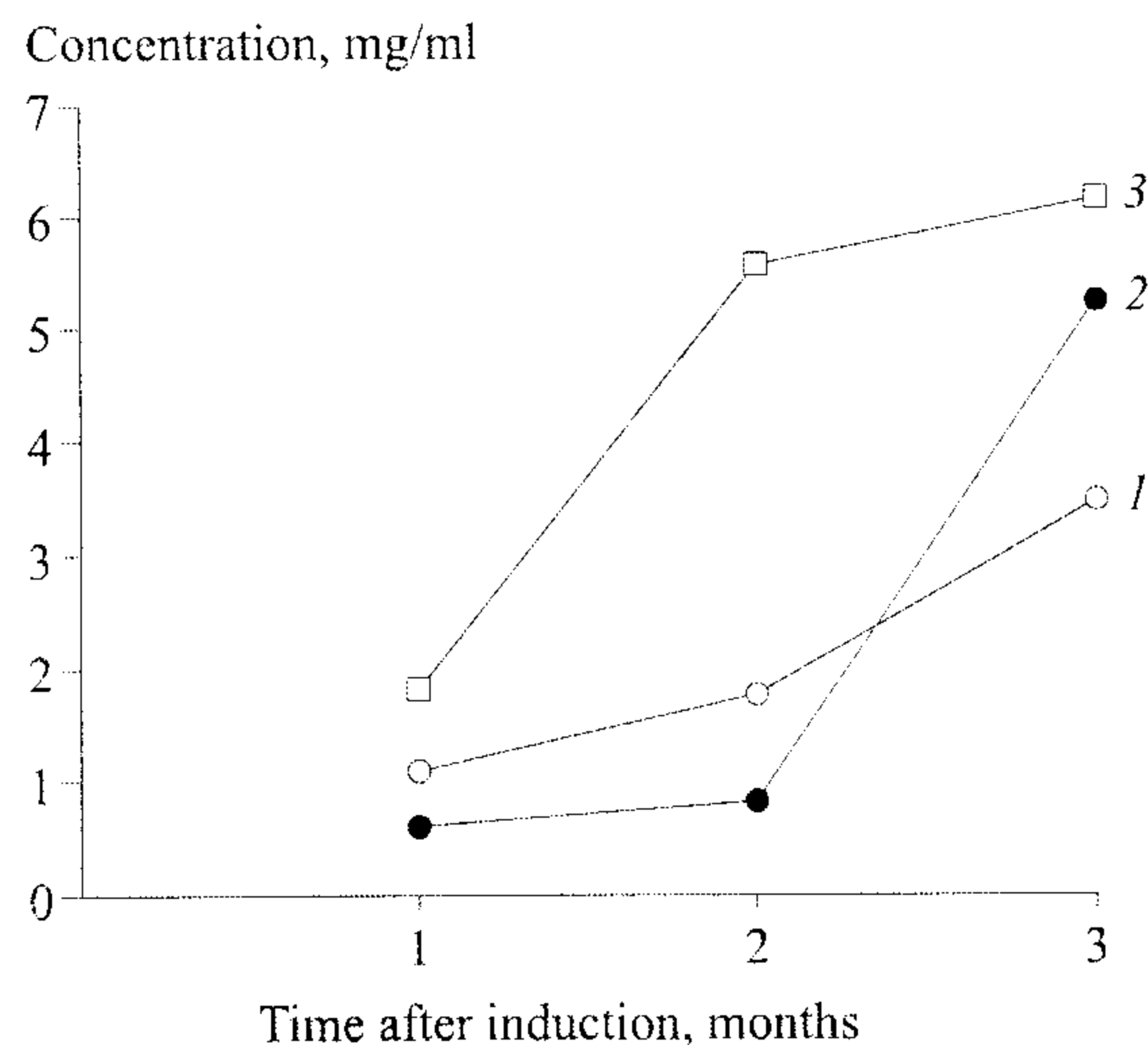


Fig. 1. Effect of treatment with muramyl dipeptide (MDP) on protein concentration in the urine of B6D2F1 mice after induction of chronic graft-versus-host reaction (GVHR). 1) chronic GVHR ($n=7$); 2) chronic GVHR+MDP (0.5 mg/kg; $n=6$); 3) chronic GVHR+MDP (1.0 mg/kg; $n=6$).

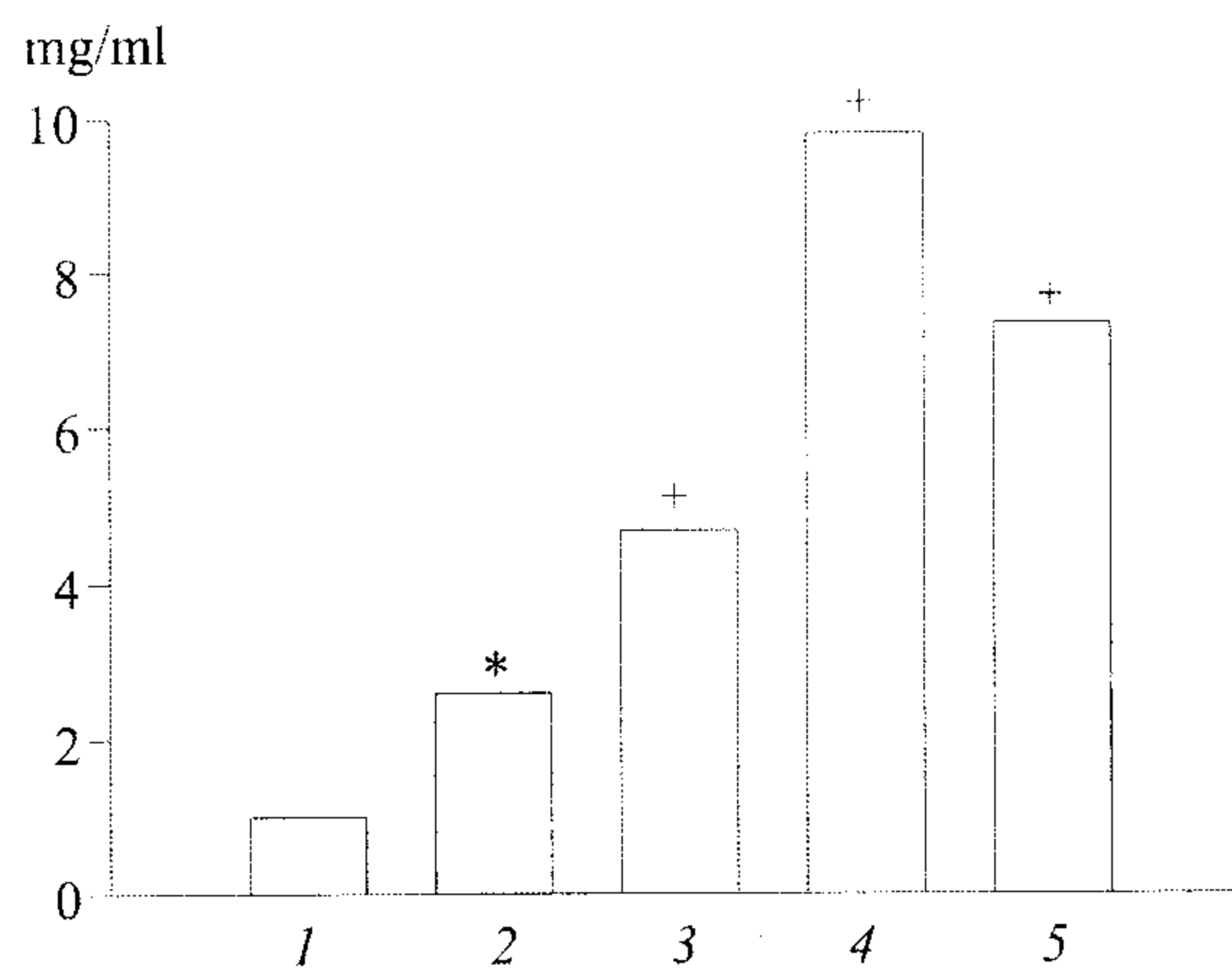


Fig. 2. Proteinuria in B6D2F1 mice treated with different drugs 3 months after induction of chronic GVHR. Ordinate: protein concentration in the urine compared to intact control. 1) intact mice ($n=8$); 2) chronic GVHR ($n=21$); 3) chronic GVHR+bisphenol A ($n=11$); 4) chronic GVHR+MDP (1.0 mg/kg; $n=6$); 5) chronic GVHR+pentoxifylline ($n=4$). $p < 0.05$ compared to: *intact control; +chronic GVHR.

layed, but then reached the values observed after treatment with a dose of 1.0 mg/kg (Fig. 1).

Bisphenol A widely used in the industrial manufacture of plastics binds to estrogen receptors despite structural differences from the hormone. This is paralleled by decreased production of IFN- γ and IgG2a [10]. In our experiments oral treatment of the recipient mice with bisphenol A in low doses (2.5 μ g/kg) was associated with higher incidence of glomerulonephritis (63.6% vs. 33.3% in the control group; $p < 0.05$).

Pentoxifylline (drug improving microcirculation and blood rheology) is characterized by immunomo-

dulating effects: inhibits production of proinflammatory cytokines (including IFN- γ) and suppresses the development of Th1-dependent experimental allergic encephalomyelitis in mice [7]. Treatment with pentoxifylline increased the incidence of glomerulonephritis in recipient mice to 75% vs. 25% in the control group.

Protein concentration in the urine increased under the effects of the above drugs (Fig. 2), which attests to the development of nephritis [3].

Hence, the results confirm our hypothesis that the direction of the development of immunopathological process is determined by the Th1/Th2 cells ratio at the earliest stages of chronic GVHR induction, when the direction of the process can be still modified by exogenous factors.

REFERENCES

1. V. V. Vlasov, E. Yu. Rykova, I. V. Safronova, *et al.*, *Dokl. Akad. Nauk*, **382**, 844-846 (2002).
 2. V. A. Kozlov, O. T. Kudaeva, O. P. Kolesnikova, *et al.*, *Immunologiya*, No. 3, 143-146 (2002).
 3. O. P. Kolesnikova, O. T. Kudaeva, M. V. Loginov, *et al.*, *Vestn. Akad. Med. Nauk*, No. 12, 13-16 (1991).
 4. D. M. De Wit, M. Van Mechelen, C. Zanin, *et al.*, *J. Immunol.*, **150**, No. 2, 361-366 (1993).
 5. I. J. Elenkov, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1024**, 138-146 (2004).
 6. M. Kimura, K. Shimada, and Y. Kanai, *Clin. Exp. Immunol.*, **69**, No. 2, 385-393 (1987).
 7. Y. Okuda and S. Sakoda, *Immunopharmacology*, **35**, 141-148 (1996).
 8. G. A. W. Rook, R. Hernandez-Pamdo, and S. L. Lightman, *Immunol. Today*, **15**, No. 7, 301-303 (1994).
 9. V. Rus, A. Svetic, P. Nguyen, *et al.*, *J. Immunol.*, **155**, 2396-2406 (1995).
 10. C. Sawai, K. Anderson, and D. Walser-Kuntz, *Environ. Health Perspect.*, **111**, No. 16, 1883-1887 (2003).
 11. A. Senuma, E. Hagiwara, K. Nagahama, *et al.*, *Cytokine*, **20**, 23-29 (2002).
 12. V. Souvannavong, S. Brown, and A. Adam, *Cell Immunol.*, **126**, No. 1, 106-116 (1990).
-