

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 616.155.32-089.843-06:616-092:612.017.1]-078.33-092.9

В. О. Ткачев, Е. В. Ненашева, Е. В. Гойман, Н. Н. Вольский, О. Т. Кудаева,
О. П. Колесникова**УРОВЕНЬ АУТОАНТИТЕЛ К ДНК И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ ХРОНИЧЕСКОЙ
РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА**

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Для ранних сроков развития хронической реакции трансплантат против хозяина характерна метаболическая активация нейтрофилов периферической крови, проявляющаяся существенным увеличением показателей НСТ-теста. Способность нейтрофилов к генерации активных форм кислорода не коррелирует с содержанием в крови аутоантител к ДНК, возрастающим с 1-й недели индукции реакции трансплантат против хозяина. Продукция активных форм кислорода нейтрофилами снижена при Th2-зависимом варианте развития хронической реакции трансплантат против хозяина, приводящем к возникновению гломерулонефрита. Содержание аутоантител к ДНК не связано с вариантом развития хронической реакции трансплантат против хозяина.

Peripheral blood neutrophil metabolic activation showing the considerable increase of NBT-test indices is a characteristic feature for early chronic "graft-versus-host" reaction development. Neutrophil capability for oxygen active form generation does not correlate with blood content of autoantibodies to DNA increasing from the first week of "graft-versus-host" reaction. Neutrophil production of oxygen active forms is decreased at Th2-dependent variant during chronic "graft-versus-host" reaction development promoting glomerulonephritis appearance. And autoantibody level to DNA is not connected with the variant of chronic "graft-versus-host" reaction development.

Хроническая реакция трансплантат против хозяина (РТПХ), вызванная переносом полуаллогенных лимфоидных клеток от родителей гибридам первого поколения, сопровождается поликлональной активацией В-клеток хозяина, продукцией аутоантител, в том числе антител к ДНК и экстрагируемыми ядерными антигенами, и приводит к развитию аутоиммунной патологии [7, 11]. Ранее нами было показано, что данная реакция может развиваться по двум клиническим вариантам, первый из которых приводит к возникновению люпус-подобного иммунокомплексного гломерулонефрита, а второй вариант характеризуется развитием выраженного иммунодефицитного состояния [1, 2].

У пациентов с активными проявлениями РТПХ после трансплантации аллогенного костного мозга выявлены снижение продукции супероксидного радикала, нарушения хемотаксиса и фагоцитарно-бактерицидной активности нейтрофилов [14]. Аналогичное снижение способности нейтрофилов и моноцитов крови генерировать активные формы кислорода обнаружено у больных с активными проявлениями системной красной волчанки (СКВ) [5, 8]. Волчаночный гломерулонефрит, в патогенезе которого важную роль играют аутоантитела к ДНК, по многим показателям сходен с поражением почек при Th2-зависимом варианте хронической РТПХ.

Целью данной работы было изучение динамики изменения метаболической активности полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) крови и содержания аутоантител к ДНК у мышей после переноса полуаллогенных лимфоидных клеток с учетом клинических проявлений РТПХ.

Материалы и методы. В опытах использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов (C57BL/6хDBA/2)F₁ в возрасте 2 мес,

полученных из питомника "Рассвет" (Томск). Хроническую РТПХ вызывали переносом $65 \cdot 10^6$ лимфоидных клеток мышей линии DBA/2 реципиентам — гибридам C57BL/6хDBA/2 внутривенно двукратно с интервалом 6 дней [7]. В качестве контроля использовали интактных мышей того же генотипа, пола и возраста и гибридных мышей, которым были перенесены сингенные лимфоидные клетки в тех же количествах.

О развитии гломерулонефрита судили по появлению стойкой протеинурии (более 3 мг/мл). Содержание белка в моче определяли колориметрически ($\lambda = 570$ нм) с красителем Кумасси голубым, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

НСТ-тест. После декапитации у каждой мыши забирали по 10 мкл крови на спонтанный и стимулированный тесты. Кровь переносили в 96-луночный планшет с 10 мкл раствора гепарина 40 ЕД/мл ("Биохими" 25 000 ЕД/мл) на растворе Хенкса. В спонтанном тесте добавляли 30 мкл раствора Хенкса и 10 мкл 0,2% раствора нитросинего тетразолия (НСТ; "Serva", Германия) в растворе Хенкса; в стимулированном тесте — 20 мкл раствора Хенкса, 10 мкл продигозана ("Мосхимфармпрепараты" 0,005%) и 10 мкл 0,2% раствора НСТ в растворе Хенкса. После инкубации в течение 30 мин при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ суспензии клеток переносили на предметные стекла, фиксированные мазки окрашивали кармином ("Fluka AG", Германия). Процент нейтрофилов, содержащих гранулы формазана, подсчитывали под микроскопом.

Количество лейкоцитов в крови и относительное содержание среди них ПЯЛ определяли стандартным методом.

Определение аутоантител к ДНК методом ELISA [6]. Для определения аутоантител использовали антииммуноглобулиновые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, и о-фенилендиамин в качестве субстрата. Интенсивность окрашивания определяли с помощью "Titertec Multiskan" при $\lambda = 492$ нм. Результаты выражали в условных единицах, соотнося оптическую плотность опытных проб со средними значениями оптической плотности в контроле (от интактных мышей).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о наличии выраженной реакции системы ПЯЛ, которая заключалась в нейтропении, продолжавшейся первые 2 нед экспери-

Содержание лейкоцитов и ПЯЛ в периферической крови мышей на ранних сроках развития хронической РТПХ (средние значения)

Группа мышей	Содержание клеток в 1 мл ($\cdot 10^{-6}$)	Срок после переноса клеток, нед					
		1	2	4	8	10	12
Без РТПХ (перенос сингенных клеток)	Лейкоциты	6,08* (5—9,1)	6,45 (5,1—7,4)	9,50 (8,6—11)	11,50 (10,5—13)	12,73 (10,4—12)	6,94 (4,5—9)
	ПЯЛ	1,16* (0,8—1,4)	1,57 (1,1—2,2)	2,36 (2,1—2,4)	2,49 (2,3—2,8)	2,74 (1,9—3,2)	1,72 (0,9—2,5)
С РТПХ (перенос полуаллогенных клеток)	Лейкоциты	3,49** (1,9—4,8)	4,38** (4,1—4,8)	15,38*,*** (11—19,7)	13,04 (13—14,1)	7,63 (6,3—10)	9,06 (3,5—15)
	ПЯЛ	0,99** (0,3—1,8)	1,10** (0,7—1,3)	4,02*,*** (3,3—4,7)	3,17 (1,6—6,2)	1,82 (1,2—2,9)	2,11 (0,8—3,2)

Примечание. У интактных мышей содержание лейкоцитов составило 10,24 (6,5—14,2), ПЯЛ — 2,56 (1,5—4,9). В скобках — пределы колебаний показателя. Одна звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с интактными мышами, две — $p < 0,01$ по сравнению с интактными мышами, три — $p < 0,05$ при сравнении показателей у мышей после переносов сингенных и полуаллогенных клеток.

мента (см. таблицу). Эта реакция, по-видимому, не связана непосредственно с индукцией РТПХ, поскольку наблюдалась также у мышей после переноса сингенных клеток. В то же время индукция РТПХ вызывала изменение метаболической активности ПЯЛ, оцениваемой в НСТ-тесте. Характерной особенностью ранней стадии хронической РТПХ было резкое увеличение в периферической крови относительного содержания нейтрофилов, продуцирующих активные формы кислорода в спонтанном НСТ-тесте, со 2-й по 4-ю неделю эксперимента, при том, что перенос сингенных клеток не сопровождался достоверным увеличением количества НСТ-положительных нейтрофилов ни в одной из контрольных точек (рис. 1). Таким образом, индукция РТПХ приводила к хронической активации нейтрофилов периферической крови, что выражалось в увеличении показателей спонтанного НСТ-теста, с одновременным снижением их функциональных резервов (отсутствие достоверного стимулирующего эффекта продигозана). Эти эффекты могут быть связаны с поликлональной активацией В-клеток, сопровождающейся увеличением содержания аутоантител и иммунных комплексов в крови, способных стимулировать окислительный метаболизм нейтрофилов [3].

Отсутствие разницы в результатах спонтанного и стимулированного тестов у мышей с РТПХ со 2-й недели до конца эксперимента позволяет предположить, что наблюдаемое к 8-й неделе снижение результатов НСТ-теста до уровня интактных животных не было связано с уменьшением содержания стимулирующих факторов, а являлось следствием изменения функциональной активности ПЯЛ. Аналогичное снижение уровня окислительного метаболизма нейтрофилов, обнаруженное у больных с хронической РТПХ [14], свидетельствует, по мнению авторов, либо о нарушении созревания нейтрофилов, либо о действии на них неустановленных внеклеточных факторов.

Перенос полуаллогенных, но не сингенных, лимфоидных клеток привел к достоверному увеличению содержания антител к ДНК в сыворотке начиная с 1-й недели и до конца сроков наблюдения (рис. 2). При этом содержание антител к ДНК в сыворотке не коррелировало с относительным количеством НСТ-положительных нейтрофилов ни в одном из сроков эксперимента (данные не представлены). Также установлено, что через 4 мес после индукции РТПХ мыши с наличием и с отсутствием гломерулонефрита (обозначаемые соответственно как $Lupus^+$ и $Lupus^-$) не различались по со-

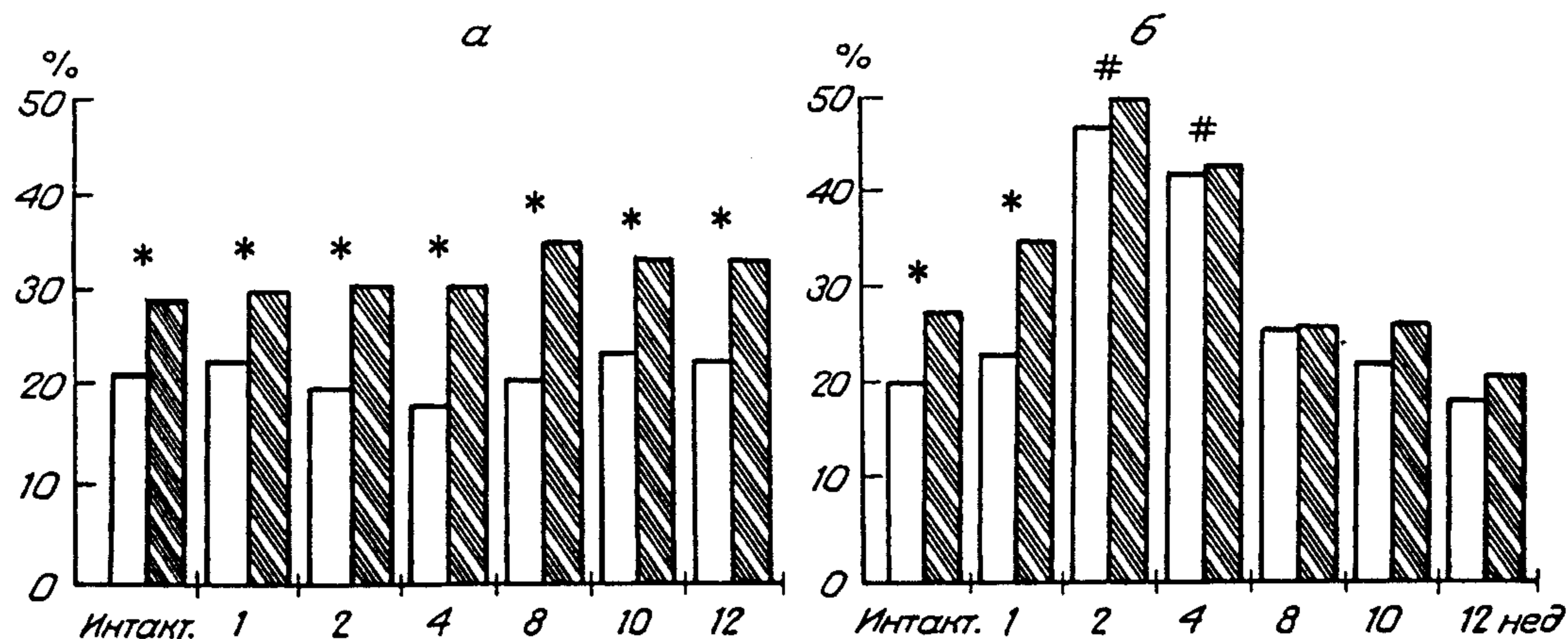


Рис. 1. Относительное содержание НСТ-положительных нейтрофилов в крови мышей после переноса сингенных (а) и полуаллогенных (б) клеток.

По осям абсцисс — сроки эксперимента (в нед), по осям ординат — процент НСТ-положительных нейтрофилов. Здесь и на рис. 3: одна звездочка — $p < 0,01$ при сравнении результатов спонтанного и стимулированного НСТ-тестов; две звездочки — $p < 0,05$ при сравнении результатов спонтанного НСТ-теста и интактных животных. Белые столбцы — спонтанный НСТ-тест, серые столбцы — стимулированный НСТ-тест.

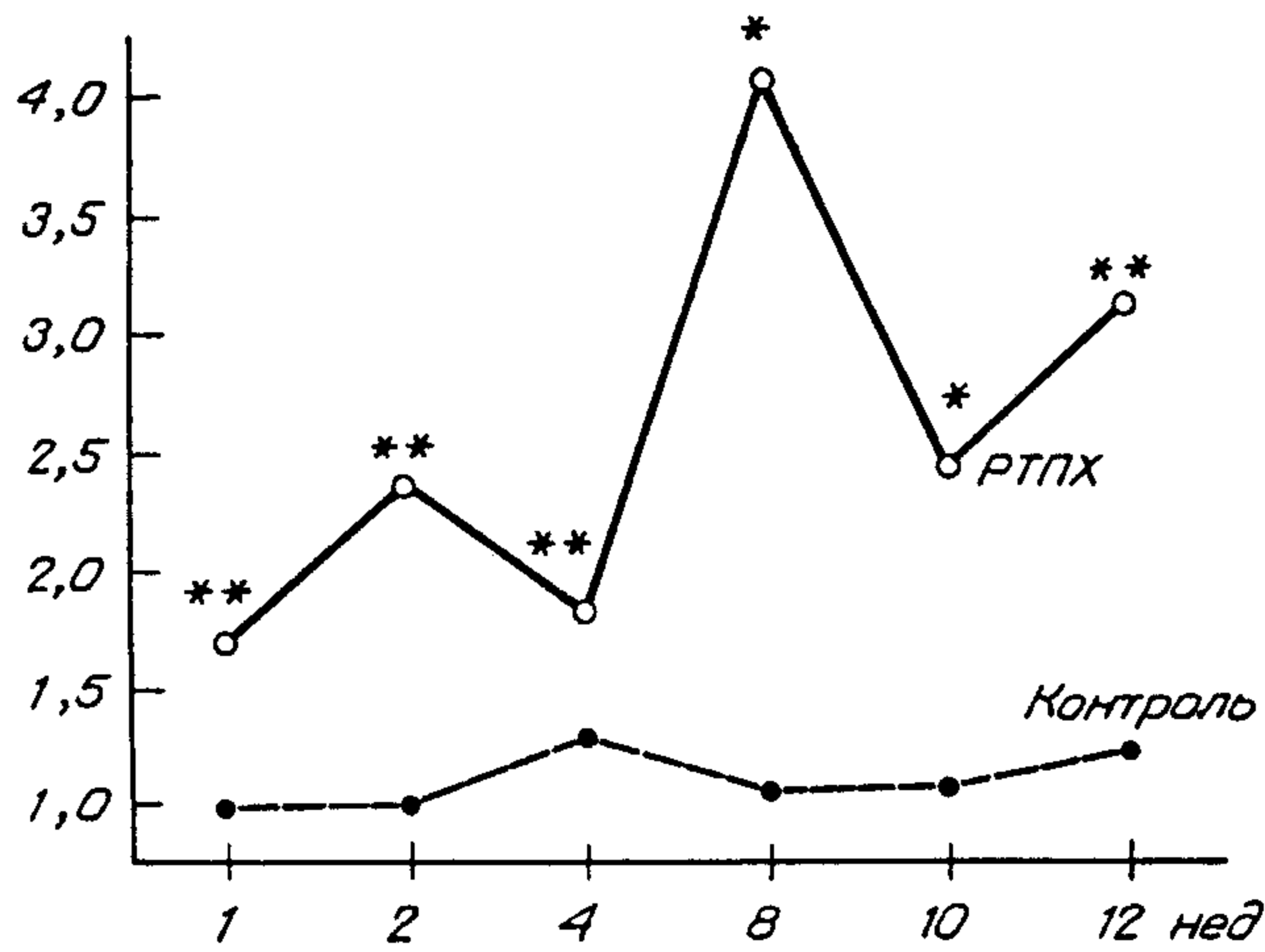


Рис. 2. Динамика содержания аутоантител к ДНК в сыворотке у мышей разных групп.

По оси абсцисс — сроки эксперимента (в нед), по оси ординат — K_D (OD_{492} экспериментальных животных / OD_{492} интактных животных). Одна звездочка — $p < 0,05$, две звездочки — $p < 0,01$ относительно контроля (перенос сингенных клеток).

держанию в сыворотке аутоантител к ДНК ($Lupus^+ = 3,38$, $Lupus^- = 4,06$; $p > 0,05$). Кроме того, у части мышей с гломерулонефритом титры антител были ниже, чем у мышей на ранних сроках РТПХ (до развития гломерулонефрита), что согласуется с результатами, полученными С. Meziere и соавт. [9]. Таким образом, несмотря на признанную патогенетическую роль аутоантител к ДНК в развитии люпусподобного гломерулонефрита, их содержание в крови в указанный срок не позволяет судить о варианте развития хронической РТПХ и наличии воспалительного поражения почек. Как известно, лишь небольшая часть циркулирующих аутоантител к ДНК является нефритогенной [13].

В поздние сроки метаболическая активность нейтрофилов достоверно зависела от варианта развития хронической РТПХ (рис. 3). После 4 мес эксперимента относительное содержание продуцирующего супероксидный радикал в НСТ-тесте нейтрофилов у мышей с гломерулонефритом было достоверно ниже, чем у интактных мышей и мышей без гломерулонефрита. При этом только мыши с протеинурией (Th2-зависимый вариант течения РТПХ) характеризовались отсутствием достоверной разницы в спонтанном и стимулированном тестах. Отсутствие достоверного увеличения продукции супероксидного радикала при стимуляции продигозаном позволяет сделать предположение об изменениях в супероксидгенерирующей ферментативной системе нейтрофилов этих животных, что приводит к сниженному ответу на эндогенные стимулы. Полученные результаты не дают возможности решить вопрос о том, появляется ли сниженная функциональная активность нейтрофилов лишь в результате индукции РТПХ или же она исходно присуща животным, у которых развивается гломерулонефрит. В то же время данные о том, что у пациентов с хроническим гранулематозом [10] — заболеванием, обусловленным генетическим дефектом супероксидпродуцирующей ферментативной системы нейтрофилов, существенно повышена частота возникновения различных форм красной

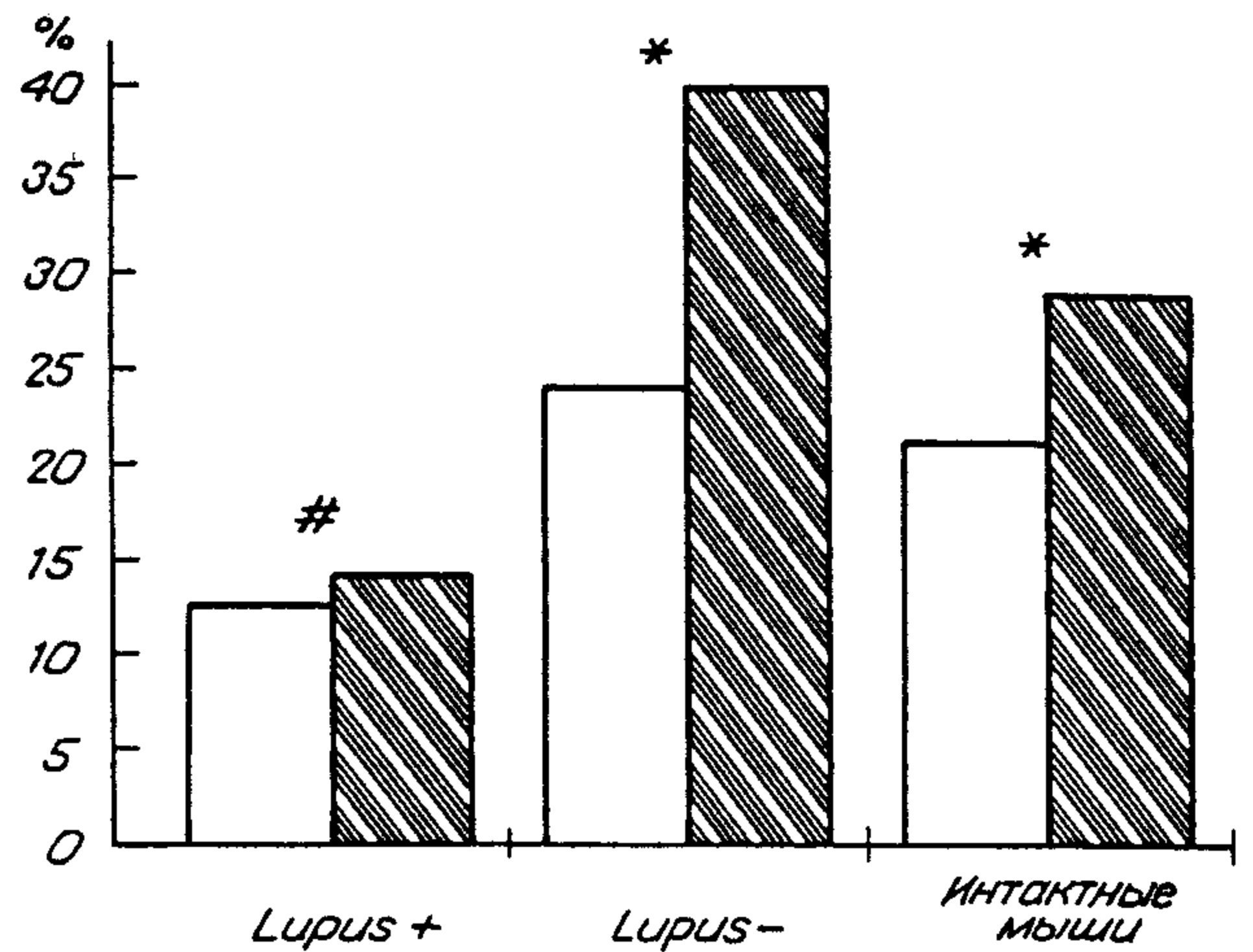


Рис. 3. Относительное содержание НСТ-положительных нейтрофилов в крови мышей с разными формами хронической РТПХ.

По оси абсцисс — группы экспериментальных животных, по оси ординат — процент НСТ-положительных нейтрофилов.

волчанки, в том числе системной красной волчанки (СКВ) [10], наводят на мысль, что выбор пути развития хронической РТПХ может быть связан с функциональным состоянием нейтрофилов.

Кроме того, результаты экспериментов хорошо согласуются с данными о снижении способности нейтрофилов к респираторному взрыву при ненарушенной дегрануляции у пациентов с активными проявлениями СКВ, что сочетается со снижением экспрессии $Fc\gamma RII$ (CD32) и $CR1$ (CD35) [8]. Известно также о нарушениях Fc -зависимого клиренса иммунных комплексов клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) у пациентов с гломерулонефритами иммунной природы [4] и об уменьшении экспрессии $CR1$ на эритроцитах пациентов с СКВ [12]. Учитывая эти данные, можно также предполагать, что нейтрофилы мышей с гломерулонефритом характеризуются снижением плотности рецепторов к компонентам комплемента и Fc -фрагментам иммуноглобулинов на мембранах клеток. При этом уменьшение способности нейтрофилов к респираторному взрыву может само по себе не иметь патогенетического значения и быть только маркером сопутствующих однотипных изменений в РЭС и системе эритрона, снижающих их способность к клиренсу иммунных комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов В. А., Кудаева О. Т., Колесникова О. П. и др. // Иммунология. — 2002. — № 3. — С. 143—147.
2. Колесникова О. П., Кудаева О. Т., Логинов М. В. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1991. — № 12. — С. 13—16.
3. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск, 1983.
4. Bannister K. M., Hay J., Clarkson A. R., Woodroffe A. J. // Am. J. Kidney Dis. — 1984. — Vol. 3, N 4. — P. 287—292.
5. Herburn A. L., Mason J. C., Davies K. A. // Rheumatology (Oxford). — 2004. — Vol. 43, N 5. — P. 547—554.
6. Immunoassay Technology. Vol. 2 / Ed. S. B. Pal. — New York, 1986. — P. 247.
7. Kimura K., Shimada K., Kanai Y. // Clin. Exp. Immunol. — 1987. — Vol. 69, N 2. — P. 385—393.
8. Marzocchi-Machado C. M., Alves C. M., Azzolini A. E. et al. // Lupus. — 2002. — Vol. 11, N 4. — P. 240—248.

-
9. *Meziere C., Stock F., Batsford S. et al. // Clin. Exp. Immunol. — 1994. — Vol. 98, N 2. — P. 287—294.*
 10. *Rupic R. A., Petropoulou Th., Belohradsky B. H. et al. // Eur. J. Dermatol. — 2000. — Vol. 10, N 3. — P. 184—189.*
 11. *Rus V., Svetic A., Nguyen P. et al. // J. Immunol. — 1995. — Vol. 155, N 5. — P. 2396—2406.*
 12. *Thomsen B. S., Nielsen H., Andersen V. // Scand. J. Rheumatol. — 1987. — Vol. 16, N 5. — P. 339—346.*
 13. *Waldman M., Madaio M. P. // Lupus. — 2005. — Vol. 14, N 1. — P. 19—24.*
 14. *Zimmerli W., Zarth A., Gratwohl A., Speck B. // Blood. — 1991. — Vol. 77, N 2. — P. 393—399.*

Поступила 01.08.05