

На правах рукописи

ГОЙМАН

Елена Владимировна

**ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ ПРОЛИФЕРАЦИЯ
В РАЗВИТИИ АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ
ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА»**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук**

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук научно-исследовательском институте клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор, академик РАМН

Владимир Александрович Козлов

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Валерий Степанович Ширинский
Анна Вениаминовна Шурлыгина

Ведущее учреждение:

Учреждение Российской академии медицинских наук научно-исследовательский институт фармакологии Сибирского отделения РАМН (634028, г.Томск, пр. Ленина, 3).

Защита состоится «__» _____ 2011 г. года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 при Научно-исследовательском институте клинической иммунологии СО РАМН по адресу: 630099, г.Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института клинической иммунологии СО РАМН.

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Ольга Петровна Колесникова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Аутоиммунные заболевания возникают вследствие патологических иммунных реакций против собственных тканей организма и представляют собой разнородную по клиническим проявлениям группу, в настоящее время включающую более 80 различных аутоиммунных синдромов, которыми болеет по разным данным до 8% населения планеты [Diamond B., 2005; Fairweather D. et al., 2008; Kutz M. and Saleh I., 2009]. Патогенез развития аутоиммунных заболеваний очень сложен, во многом не ясен и может быть обусловлен перекрёстной реакцией против собственных антигенов при ответе на инфекционные агенты, изменением антигенной структуры тканей так, что она становится иммуногенной для собственной иммунной системы, нарушением проницаемости гистогематических барьеров, иммунным дисбалансом с нарушением функциональной активности регуляторных субпопуляций лимфоцитов, а также другими причинами [Päust S. and Canton H., 2005; Goodnow G. et al, 2007; Invernizza P., 2007; Ercolini A. and Miller S., 2008].

Показано, что при лимфопении, вызванной самыми различными факторами (облучением, введением цитотоксических препаратов, различными заболеваниями), для компенсаторного устранения количественного дефицита лимфоцитов происходит включение их пролиферации на периферии. Этот процесс получил название гомеостатической пролиферации (ГП), или «пролиферации, индуцированной лимфопенией» [Khoruts A. et al., 2005]. Гомеостатическая пролиферация в ответ на снижение числа соответствующих клеток свойственна всем популяциям лимфоцитов (Т-, В- и NK-клеткам), но требует наличия различных сигналов. Так, необходимым условием гомеостатической пролиферации наивных CD4⁺ Т-клеток является высокая концентрация ИЛ-7 и распознавание комплексов МНС с собственными пептидами, при этом интенсивность пролиферации находится в прямой зависимости от avidности взаимодействия. В то же время, считается, что гомеостатическая пролиферация CD4⁺ Т-клеток памяти поддерживается ИЛ-7, ИЛ-15 и менее зависит от распознавания аутопептидов [Goldrath A. W. et al., 2002; Woodland R.T. et al., 2005; Vaccala R. et al., 2005; Lee S. et al., 2005].

Характерными признаками ГП являются: 1) наличие лимфопении; 2) присутствие ИЛ-7; 3) дифференцировка наивных клеток в клетки памяти, сопровождающаяся соответствующей сменой фенотипа; 4) выраженная экспансия клеточных элементов [Fry T. and Mackall C., 2005].

Процесс ГП приводит к снижению разнообразия распознающих антигены рецепторов и появлению в значимом количестве аутореактивных эффекторных клеток, что подтверждается клиническими и экспериментальными исследованиями. Показано, что при многих аутоиммунных заболеваниях наблюдается лимфопения (ревматоидный артрит, СКВ, диабет I типа) [Schulze-Koops H.,

2004; Datta S. and Sarvetnick N., 2009]. Известно также, что летальное облучение, химиотерапия, вирусная инфекция, иммуносупрессивная терапия сопровождаются лимфопенией и параллельным увеличением частоты развития аутоиммунных расстройств [Theofilopoulos A.N. et al., 2001; King C. et al., 2004; Kieper W.C. et al., 2005; Marleau A. et al., 2005]. Таким образом, в настоящее время гомеостатическая пролиферация лимфоцитов рассматривается в качестве одного из возможных механизмов возникновения аутоиммунных заболеваний [Ярилин А. А., 2004; Baccala R. et al., 2005; Marleau A.M. et al., 2005; Krupica T. et al., 2006].

Хроническая реакция трансплантат против хозяина (хРТПХ) является классической экспериментальной моделью аутоиммунных заболеваний человека, позволяющей изучать механизмы формирования иммунопатологических процессов и разрабатывать схемы корригирующей терапии [Козлов В.А. и др., 2002; Murphy W.J., 2000; Slayback D.L. et al., 2000]. Гомеостатическая пролиферация лимфоцитов может быть одним из факторов возникновения аутоиммунной патологии при хРТПХ.

Целью настоящего исследования являлось изучение процесса гомеостатической пролиферации при развитии аутоиммунной патологии, в модели хронической РТПХ.

В соответствии с целью поставлены следующие задачи исследования:

1. Изучить морфо-функциональные параметры реципиентов для характеристики аутоиммунной патологии, индуцированной хронической РТПХ.
2. Исследовать параметры иммунной системы, характерные для процесса гомеостатической пролиферации, в динамике хронической РТПХ, приводящей к аутоиммунной патологии.
3. Оценить влияние препаратов, изменяющих частоту развития аутоиммунной патологии при хронической РТПХ, на выраженность лимфопении и гомеостатической пролиферации у реципиентов.
4. Исследовать возможность компенсации лимфопении после трансплантации сингенных лимфоцитов при аутоиммунной патологии в модели хронической РТПХ.

Научная новизна работы

Обнаружено, что ранние этапы хронической РТПХ сопровождаются возрастанием концентрации IL-7 в периферической крови реципиентов, которая остаётся на повышенном уровне у *lupus*-мышей с развившимся аутоиммунным гломерулонефритом. На начальных стадиях развития хРТПХ также отмечается повышение абсолютного содержания наивных клеток (CD45RB^{high}) и клеток памяти (CD45RB^{low}) среди CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов селезёнки, при этом несмотря на увеличение обеих субпопуляций соотношение сдвинуто в сторону клеток памяти, что является признаком гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов. Такое изменение субпопуляционного состава сохраняется у реципиентов после

окончательного формирования клинических исходов; возрастание количества Т-лимфоцитов с фенотипом клеток памяти $CD4^+CD45RB^{low}$ и $CD8^+CD45RB^{low}$ в селезенке более выражено у мышей с развившимся аутоиммунным гломерулонефритом.

Показано, что формирование аутоиммунного гломерулонефрита в данной модели связано с развитием лимфопении на ранних этапах хРТПХ. Введение дегидроэпиадростерона сульфата сокращает длительность лимфопении и снижает частоту возникновения аутоиммунного поражения почек по сравнению с введением мурамилидицептида, усиливающим развитие аутоиммунной патологии при хронической РТПХ.

Морфологическое исследование почек экспериментальных животных с индуцированной хРТПХ подтвердило наличие выраженного аутоиммунного гломерулонефрита в группе *hupis*-реципиентов и возможность её коррекции летальным облучением с последующим введением клеток сингенного костного мозга.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Процесс гомеостатической пролиферации впервые обнаружен при развитии аутоиммунной патологии, вызванной хронической реакцией «трансплантат против хозяина». Индукция хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6хDBA/2)F1 может служить экспериментальной моделью для изучения закономерностей гомеостатической пролиферации и возможности её регуляции.

Установленная сопряжённость развития лимфопении и гомеостатической пролиферации при хронической РТПХ является основой для разработки в дальнейшем новых критериев прогноза возникновения и развития аутоиммунной патологии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Лимфопения на ранних стадиях хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6хDBA/2)F1 сопряжена с формированием аутоиммунного гломерулонефрита.

2. Гомеостатическая пролиферация Т-лимфоцитов является важным признаком развития аутоиммунной патологии, индуцированной хронической РТПХ.

Личный вклад автора в проведение исследований. Все представленные результаты экспериментальных исследований получены лично автором, либо при его непосредственном участии.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на отчетных сессиях Института клинической иммунологии СО РАМН (2006 и 2011 г.г.); Всероссийских научно-практических конференциях «Дни иммунологии в Сибири» (Омск 2007 г., Томск 2008 г., Красноярск 2010 г., Абакан 2011 г.); на II Объединенном иммунологическом форуме РААКИ и РНОИ (г. Санкт-

Петербург 2008 г.). Аprobация диссертации состоялась 21 апреля 2011г. на семинаре Института клинической иммунологии СО РАМН.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертационных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и библиографического указателя. Работа изложена на 121 странице машинописного текста, иллюстрирована 25 рисунками и 10 таблицами. Список литературы включает 228 источников (13 отечественных и 215 зарубежных).

Работа выполнена на базе лаборатории экспериментальной иммунотерапии отдела экспериментальной иммунологии Института клинической иммунологии СО РАМН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе использовали мышей гибридов первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1 (B6D2F1), самок; мышей линий DBA/2 самок; полученных из лаборатории экспериментальных животных (моделей) НИИКИ СО РАМН (г. Новосибирск). В опытах использовались мыши в возрасте 2 - 8 месяцев. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Клетки и органы выделяли по стандартным методикам [Гольдберг Е.Д. и др., 1992].

Индукцию хронической РТПХ у мышей осуществляли путём переноса самкам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Клетки селезёнки, выделенных ех тетро, внутривенно вводили реципиентам в дозе $60-70 \times 10^6$ клеток двукратно с интервалом в 5 дней [Кипига М. et al., 1987]. В качестве контрольной группы использовали интактных животных того же генотипа, пола, возраста, что и в опыте.

Количество кроветворных клеток-предшественников определяли методом экзогенного колониеобразования в селезёнках летально облученных сингенных реципиентов и с использованием 0,9% метилцеллюлозной культуры (MethoCult M3450 «Stem Cell Technologies»); для оценки числа клеток в S-фазе использовали цитозин-арабинозид [Гольдберг Е.Д. и др., 1992].

Для морфометрии применяли квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. При использовании объектива с увеличением X10 конечная площадь тестового квадрата была равна 625 мкм^2 (сторона квадрата 25

мкм), при использовании объектива с увеличением X25 – 100 мкм² (сторона квадрата 10 мкм), при использовании объектива с увеличением X40 – 36 мкм² (сторона квадрата 6 мкм).

Методом проточной цитофлуориметрии определяли содержание субпопуляций лимфоцитов в клеточной суспензии селезёнки определяли, используя антитела к поверхностным маркерам мыши CD4, CD8, CD19, CD22 и CD45RB^{low/high}, конъюгированные с FITC и PE (Becton Dickinson, США), с помощью проточного цитометра FACSCalibur по программе CellQuest (Becton Dickinson, США).

Определение средней длины теломерных районов ДНК проводили методом гибридизации *in situ* Flow-FISH, с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. Мышиные спленоциты, отмытые забуференным физиологическим раствором, разносили в разные пробирки и метили биотинилированными антителами против CD19⁺. На клеточном сортере FACSaria (Becton Dickinson, США) при помощи бус (Accudrop, Becton Dickinson, США) выделяли отдельно CD4⁺- и CD8⁺- субпопуляции, которые метили биотинилированными антителами против CD45RB. Анализ проб проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), с помощью программного обеспечения Cell Quest^{PRO} (Becton Dickinson, США). Сигнал флуоресценции теломер исследуемых клеток определяли как средний уровень флуоресценции клеток, находящихся в G₀/G₁ фазе клеточного цикла, вычитанием фоновой аутофлуоресценции.

Концентрацию IL-7, IL-15 в периферической крови определяли твёрдофазным вариантом метода иммуноферментного анализа (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Содержание антител к дцДНК определяли методом иммуноферментного анализа с помощью меченого пероксидазой хрена конъюгата и о-фенилендиамина в качестве субстрата [Кэтти Д. and Райкундалива Ч., 1991]. Интенсивность реакции оценивали на многоканальном спектрофотометре «Multiskan» при $\lambda=492$ nm. Результаты выражали в единицах оптической плотности (OD опытного образца - OD контроля).

Облучение животных проводили на аппарате РУМ-150/30-101 при мощности дозы 0.5 Гр/мин, напряжении 130 кВ, силе тока 10мА, фильтре А1-3.2.12.

Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Кумасси бриллиантовый синий [Bradford M.M., 1976]. Калибровочную кривую строили по бычьему сывороточному альбумину (100-1000 мкг/мл), результаты (среднее двух измерений) выражали в мг/мл. О развитии гломерулонефрита судили по появлению стойкой протеинурии (не менее 3 мг/мл в двух последовательных измерениях).

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием критериев U Вилкоксона-Манна-

Уитни и ϕ -критерия для сравнения выборочных долей вариант [Гублер Е.В., 1978; Урбах В.Ю., 1963].

На рисунках и в таблицах результаты экспериментов представлены в виде средних значений измеряемых параметров (M); кроме специально оговоренных случаев, отмечены достоверные различия ($p < 0.05$): * - между контрольной и опытной группой; # - между опытными группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфо-функциональная характеристика реципиентов с аутоиммунным заболеванием почек в модели хронической РТПХ

К одной из широко используемых в последние годы моделей относится хРТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→(C57Bl/6хDBA/2)F1 [Козлов В.А. и др., 2002; Gleichmann E. et al., 1984; Murphy W.J., 2000; Slayback D.L. et al., 2000], которая приводит к поликлональной активации В-лимфоцитов реципиента, продукции аутоантител разной специфичности, в том числе антител к ДНК, образованию иммунных комплексов, их отложению в кашеилярной сети клубочков и, в конечном итоге, к развитию у реципиентов аутоиммунного гломерулонефрита, по ряду признаков аналогичного нефриту при системной красной волчанке [Китца М. et al., 1987]. Детальное изучение хРТПХ, индуцированной в данной полуаллогенной системе, показало, что она может развиваться по двум альтернативным вариантам: Th1- и Th2-зависимому пути. Данные варианты включают различные иммунопатологические процессы и приводят к разным клиническим проявлениям. Так, при Th2-варианте развивается аутоиммунное поражение почек, протекающее по типу иммунокомплексного гломерулонефрита, тогда как Th1-ассоциированный вариант приводит к выраженному подавлению гуморального звена иммунитета и не сопровождается поражением почек [Козлов В. А., 2002].

Морфологическое изучение почек реципиентов в настоящей работе показало наличие у *lupus*-реципиентов значительных по размерам лейкоцитарных инфильтратов, в которых наряду с лимфоцитами и макрофагами представлены в значительном количестве плазматические клетки. Все патологические изменения у *lupus*-мышей свидетельствуют об остром активном гломерулонефрите, протекающем длительное время, о чём свидетельствуют различный клеточный состав лейкоцитарных инфильтратов, большое количество цилиндров, деструктивные изменения клубочков и отсутствие признаков снижения активности (преобладание лимфоцитов и макрофагов в цитограмме большинства инфильтратов) или перехода процесса в хронический (отсутствие признаков склероза). Подобная картина не характерна для *nonlupus*-мышей. Летальное облучение *lupus*-реципиентов с последующим введением животным клеток сингенного костного мозга уже через 1 месяц приводит к снижению концентрации белка в

моче, уровень которого через 6 месяцев не отличается от контрольных значений (рис. 1).

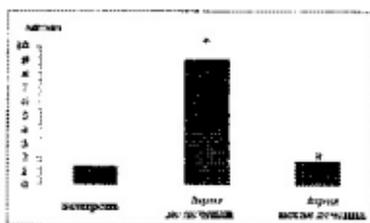


Рис.1. Концентрация белка в моче экспериментальных животных

Число животных в группах – 10. Группа *lupus* до лечения – 3 месяца после индукции ХРПХ; группа *lupus* после лечения – 6 месяцев после летального облучения и введения сингенного костного мозга. * - между контролем и *lupus* до лечения; # - между *lupus* до лечения и *lupus* после лечения.

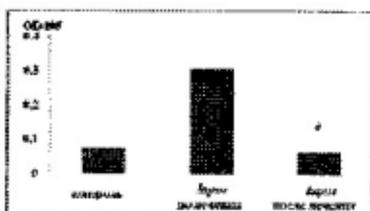


Рис.2. Уровень анти-ДНК антител в крови экспериментальных животных

Число животных в группах – 10. Группа *lupus* до лечения – 3 месяца после индукции ХРПХ; группа *lupus* после лечения – 6 месяцев после летального облучения и введения сингенного костного мозга. # - между *lupus* до лечения и *lupus* после лечения.

Коррекция клинических проявлений гломерулонефрита сопровождается исчезновением антител к ДНК класса IgG из периферической крови (рис. 2). Кроме того, наблюдается резкое снижение количества плазматических клеток в лейкоцитарных инфильтратах коркового вещества почки, в большом количестве присутствующих у *lupus*-мышей; после корригирующей терапии их количество практически не отличается от значений контрольной группы.

Летальное облучение *lupus*-реципиентов и последующее введение им клеток сингенного костного мозга приводит к ослаблению выраженности морфологических признаков поражения почечной ткани и исчезновению клинических проявлений гломерулонефрита – протеинурии.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение, что проведенная процедура останавливает развитие хронической РПХ и подавляет индуцированный ею аутоиммунный процесс в почках.

Изучение параметров иммунной системы, характерных для процесса гомеостатической пролиферации, у реципиентов в динамике хронической РПХ

Количественные параметры содержания лимфоцитов в периферической крови у мышей при хронической РТПХ

Процесс гомеостатической пролиферации лимфоцитов запускается снижением их количества на периферии [Ярилин А.А., 2004; Khoruts A. et al., 2005; Krupica T. J. et al., 2006; Vassala R. and Theofilopoulos A.N., 2006]. В связи с этим определяли количество и субпопуляционный состав лимфоцитов у реципиентов в динамике хРТПХ. Так как в ранние сроки после индукции невозможно определить, по какому варианту будет развиваться реакция, поэтому анализ формирования окончательных исходов хРТПХ проводили в суммарной группе реципиентов.

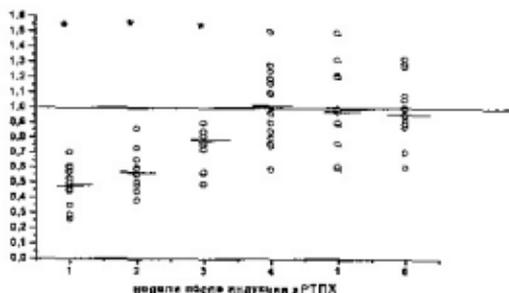


Рис.3. Содержание лимфоцитов в периферической крови у мышей после индукции хронической РТПХ

Данные представлены относительно значений контроля, принятых за 1.

* - различия между опытной и контрольной группами достоверны, $p < 0,05$, $n = 24$.

Оценка содержания лимфоцитов в периферической крови реципиентов после переноса полуаллогенных лимфоидных клеток в динамике выявила резкое падение их количества на раннем этапе развития хРТПХ (рис.3). Это снижение держится в течение четырех недель и затем сменяется нормализацией до уровня контрольных животных на фоне развивающейся спленомегалии. Механизм возникновения лимфопении при хРТПХ не ясен. Учитывая, что она сопровождается возрастанием количества клеток в костном мозге, можно предположить, что падение числа клеток в периферическом русле связано со снижением их выхода из костного мозга на периферию.

Таким образом, ранние стадии развития хронической РТПХ характеризуются лимфопенией, что может предполагать последующее включение гомеостатической пролиферации лимфоцитов.

Определение уровня цитокинов в периферической крови реципиентов с хронической РТПХ

Поскольку известно, что основными цитокинами в реализации процесса гомеостатической пролиферации являются IL-7 и IL-15 [Lee S. et al., 2005;

Sandau M. et al., 2007; Calzascia T. et al., 2009; Guimond M. et al., 2009; Jacobs S. et al., 2010], мы определяли уровень IL-7 и IL-15 в динамике хронической РТПХ - на начальных этапах реакции и при окончательном формировании клинических исходов.

Оценка уровня IL-7 выявила его резкое возрастание в периферической крови реципиентов в ранние сроки, сопровождающиеся лимфопенией.

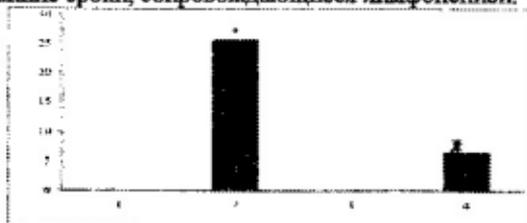


Рис.4. Концентрация IL-7 в периферической крови у экспериментальных животных после индукции хронической РТПХ

По оси ординат - концентрация IL-7 в пг/мл. По оси абсцисс - группы экспериментальных животных. 1- контроль (n=8), 2- через 2 недели после индукции хронической РТПХ (n=8), 3- через 3 месяца после индукции хронической РТПХ *nonlupus* (n=8), 4- через 3 месяца после индукции хронической РТПХ *lupus* (n=8).

У *lupus*-реципиентов в отличие от *nonlupus*-реципиентов повышенное содержание IL-7 в периферической крови сохраняется и через 3 месяца, что говорит о наличии факторов, необходимых для поддержания процесса ГП в этой группе. Уровень IL-7 в контроле и у *nonlupus*-реципиентов оказался ниже порога чувствительности использованного метода (рис.4). Уровень IL-15 в нашем исследовании оказался ниже порога чувствительности использованного метода (100 pg/ml). В последнее время появились новые литературные данные о сложности определения "цитокина-невидимки" IL-15 в биологических жидкостях [Van Belle T. and Grooten J., 2005]. Причина трудностей определения IL-15 связана со своеобразным механизмом его действия, который заключается в непосредственном клеточно-контактном взаимодействии IL-15 и его рецептора с клеткой-мишенью. Отсутствие подъема концентрации IL-15 в периферической крови не может свидетельствовать против его участия в процессе ГП.

Таким образом, развитие хронической РТПХ приводит к подъему концентрации IL-7 на ранних этапах, сопровождающихся лимфопенией, и сохраняется на высоком уровне у *lupus*-реципиентов.

Субпопуляционный состав лимфоцитов в селезенке реципиентов в динамике развития хронической РТПХ

Так как процесс ГП сопровождается изменением соотношения субпопуляций лимфоцитов и, в первую очередь, непропорциональным увеличением количества клеток памяти, мы оценивали количество наивных клеток и клеток

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

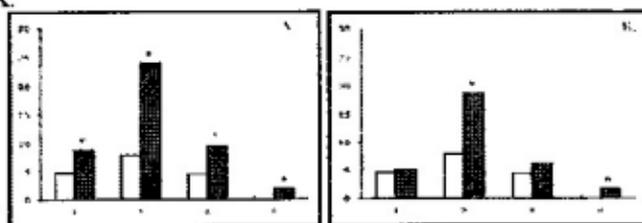


Рис.5. Абсолютное содержание субпопуляций Т-клеток на ранних этапах развития хронической РТПХ

А. Неделя после индукции хРТПХ. Б. Месяц после индукции хРТПХ.

По оси ординат – количество клеток, $\times 10^6$. По оси абсцисс – субпопуляции Т-клеток.

1 - CD4⁺ CD45RB^{high}, 2 - CD4⁺ CD45RB^{low}, 3 - CD8⁺ CD45RB^{high}, 4 - CD8⁺ CD45RB^{low}.
Белые столбики – контрольная группа (n=16), серые столбики – опытная группа (n=16).

На начальных стадиях развития реакции обнаружено возрастание абсолютного количества CD4⁺- и CD8⁺-субпопуляций в селезенке, причём увеличивается число как наивных клеток CD4⁺ и CD8⁺, так и клеток памяти CD4⁺ и CD8⁺. В дальнейшем содержание клеток памяти CD4⁺ и CD8⁺ остаётся повышенным, тогда как количество наивных Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ после подъема начинает снижаться (рис 5).

Изменение количества субпопуляций в этот период может быть связано с несколькими возможными причинами: трансплантацией большого количества клеток при индукции хРТПХ, с пролиферацией антиген-реактивных лимфоцитов донора, а также с гомеостатической пролиферацией клеток реципиента.

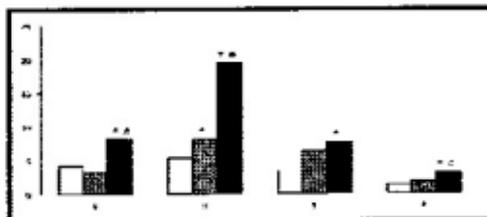


Рис.6. Абсолютное содержание субпопуляций Т-клеток при хронической РТПХ (3 месяца после индукции хРТПХ)

По оси ординат – количество клеток, $\times 10^6$. По оси абсцисс – субпопуляции Т-клеток.

1 - CD4⁺ CD45RB^{high}, 2 - CD4⁺ CD45RB^{low}, 3 - CD8⁺ CD45RB^{high}, 4 - CD8⁺ CD45RB^{low}.
Белые столбики – контрольная группа (n=8), серые столбики – nonlupus (n=8), черные столбики – lupus (n=8).

У lupus-реципиентов через 3 месяца сохраняется повышенное содержание CD4⁺- и CD8⁺-субпопуляций с фенотипом клеток памяти в селезенке по сравнению с контрольными животными и nonlupus-реципиентами (рис 6). У lupus-

реципиентов также возрастает число наивных CD4⁺- и CD8⁺-клеток в селезенке, что может быть вызвано активацией процессов миграции из тимуса, который остаётся достаточно сохранным при хронической форме РТПХ.

Возрастание доли клеток памяти в этот период не может быть объяснено антигенной стимуляцией Т-лимфоцитов донора, так как на поздних стадиях развития хРТПХ Т-клеточный химеризм у реципиентов в изучаемой модели составляет всего 2% и, следовательно, CD4⁺CD45RB^{low}- и CD8⁺CD45RB^{low}-клетки в селезенке *lypus*-мышей представляют собой, в основном, клетки реципиента [Via C.S. and Shearer G.M., 1988].

Таким образом, в отличие от *nonlypus*-реципиентов у *lypus*-мышей в селезенке возрастает количество Т-клеток с фенотипом клеток памяти (CD4⁺CD45RB^{low} и CD8⁺CD45RB^{low}), что является характерным признаком процесса гомеостатической пролиферации лимфоцитов.

Определение средней длины теломерных районов ДНК при хронической РТПХ

Длина теломерных районов ДНК является значимым показателем пролиферативного потенциала клетки. Предполагается, что в условиях гомеостатической пролиферации происходит укорочение теломерных районов ДНК [Gogonzy J. et al., 2006]. Показано, что при некоторых аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, атопический дерматит и другие) отмечается укорочение теломерных районов ДНК [Weng N., 2008; Calado R. and Young N., 2009; Oeseburg H. et al., 2009].

Первоначально длину теломерных районов ДНК определяли в общей популяции лимфоцитов селезенки. Результаты проведенных исследований показывают, что на начальных этапах развития хРТПХ отмечается тенденция к увеличению длины теломерных районов ДНК в общей популяции спленоцитов у реципиентов относительно контрольной группы животных, хотя изменения не достоверны (табл.1).

Таблица 1

Длина теломерных районов ДНК в спленоцитах при хронической РТПХ, (M, min-max)

| Показатель | 2 недели после индукции хРТПХ | | месяц после индукции хРТПХ | |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------|
| | контроль (n=16) | опыт (n=16) | контроль (n=6) | опыт (n=9) |
| Длина (пар нуклеотидов) | 44970 32335-55405 | 46970 38348-56407 | 47029 36967-50532 | 51523 4420-57104 |

При окончательном формировании аутоиммунного процесса длина теломерных районов ДНК у *lypus*-реципиентов также значимо не отличается от контрольной группы животных и *nonlypus*-реципиентов (табл.2).

Таблица 2

Длина теломерных районов ДНК в спленоцитах у *nonlupus*- и *lupus*-реципиентов, (M, min-max)

| Показатель | контроль n=8 | <i>nonlupus</i> n=8 | <i>lupus</i> n=8 |
|-------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| Длина (пар нуклеотидов) | 39323 28531-42392 | 39074 33412-50196 | 40359 26841-46516 |

Так как разные субпопуляции клеток принимают разное участие в развитии хронической РТПХ и формировании аутоиммунной патологии и, следовательно, проявляют разную пролиферативную активность, в дальнейшем мы оценивали длину теломерных районов ДНК в отдельных субпопуляциях лимфоцитов. Анализ длины теломерных повторов ДНК в naïвных клетках и клетках памяти среди CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов селезенки не выявил значимых изменений этого параметра у *lupus*-реципиентов; длина теломерных районов ДНК достоверно увеличена в CD8⁺-клетках памяти у *nonlupus*-реципиентов по сравнению с контрольной группой животных. CD19⁺-лимфоцитах селезенки изменений в длине теломерных повторов отмечено не было (табл.3). Возможно, причиной этого является активация теломеразы в лимфоидных клетках реципиентов. Так, показано, что IL-7, уровень которого повышался при полуаллогенном переносе в нашей работе, вызывает активацию теломеразы [Beier F.et al.,2007; Tarhan F.et al., 2008].

Однако в отношении системной красной волчанки данные противоречивы; некоторые авторы находят, напротив, увеличение длины теломер при СКВ [Andrews N.P. et al,2009].

Таблица 3

Длина теломерных районов ДНК в CD4⁺-, CD8⁺ и CD19⁺-спленоцитах у *nonlupus*- и *lupus*-реципиентов, (M, min-max)

| Показатели | контроль n=5 | <i>nonlupus</i> n=5 | <i>lupus</i> n=5 |
|--|----------------------|------------------------|------------------------|
| CD4 ⁺ CD45RB ^{high} в п. н. | 26441 24350-29962 | 27013 24151 - 28183 | 26877 24202 - 28818 |
| CD4 ⁺ CD45RB ^{low} в п. н. | 25523 22338-27412 | 27077 24112- 28221 | 26776 24398 - 29318 |
| CD8 ⁺ CD45RB ^{high} в п. н. | 27455 26576-29027 | 28553 26251 - 31586 | 27501 25622 - 28665 |
| CD8 ⁺ CD45RB ^{low} в п. н. | 26165 24821-27512 | 28695* 26644- 31606 | 27954 25956 - 31292 |
| CD19 ⁺ в п. н. | 30807 26884-33561 | 31886 28910 - 33333 | 31688 29348 - 34322 |

Таким образом, анализ длины теломерных районов ДНК не выявил их укорочения у *lupus*-реципиентов по сравнению с контролем.

Исследование связи между уровнем лимфопении и частотой развития аутоиммунной патологии

Влияние препаратов, меняющих частоту развития аутоиммунной патологии, на выраженность лимфопении и ГП у реципиентов

Ранее нами было установлено, что дегидроэпандростерон сульфат (DHEA-S) и мурамилдипептид (MDP), обладая способностью направлять хроническую РТПХ по Th1-пути и Th2-пути развития, соответственно, снижают или увеличивают частоту формирования аутоиммунного поражения почек [Кудасва О.Т. с соавт., 2005].

Представляло интерес оценить выраженность лимфопении на ранних стадиях развития хРТПХ в условиях модуляции ее течения с помощью этих препаратов (DHEA-S и MDP) исходя из следующего предположения. Так как на ранних стадиях хРТПХ мы не можем отдельно характеризовать *lupus*- и *nonlupus*-мышей, а вынуждены оценивать всех реципиентов в целом, то мы с помощью препаратов максимально сдвигаем соотношение *lupus/nonlupus* в одну или в другую сторону и, оценивая всю опытную группу целиком, считаем, что характеризуем в каждом случае преимущественно *lupus*- (группа с введением MDP) или *nonlupus*-реципиентов (группа с введением DHEA-S).

DHEA-S считается стимулятором Th1-клеток [Stam W.B. et al., 1993; Rook G.A. et al., 1994; Sudo N. et al., 2001]. Мурамилдипептид, дериват клеточной стенки бактерий, обладая адьювантным действием, вызывает поликлональную активацию В-клеток и усиливает стимулирующее влияние IL-4 на активированные В-лимфоциты [Souvannavong V. et al., 1990]. Контрольной группой в данной серии экспериментов служили реципиенты с индукцией хРТПХ без каких-либо дополнительных воздействий.

В экспериментальной группе, которой наряду с индукцией хРТПХ вводили DHEA-S, отмечается снижение частоты развития аутоиммунного гломеруло-нефрита; введение MDP, напротив, приводит к увеличению доли реципиентов с аутоиммунной патологией (рис. 7).

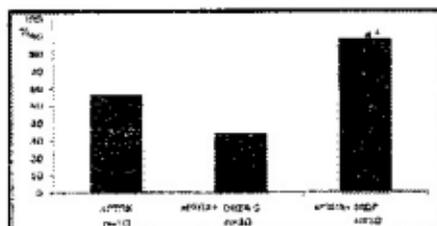


Рис. 7. Частота развития аутоиммунного гломеруло-нефрита при индукции хронической РТПХ в разных экспериментальных группах

По оси ординат: количество животных с уровнем протеинурии > 3мг/дл, % от общего числа.

* - по сравнению с хРТПХ, # - по сравнению с хРТПХ+DHEA-S.

Таким образом, определение количества лимфоцитов в периферической крови реципиентов в динамике развития хРТПХ показало, что введение DHEA-S приводит к менее продолжительной и слабее выраженной лимфопении по сравнению с контрольной группой и реципиентами, которым вводили MDP: число лимфоцитов периферической крови у реципиентов, которым вводили DHEA-S, нормализуется уже ко второй неделе после индукции реакции (табл.4).

Таблица 4

Количество лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови животных различных экспериментальных групп, (M, min-max)

| Параметр | контроль n=10 | хРТПХ n=10 | хРТПХ+ DHEA-S n=10 | хРТПХ+MDP n=10 |
|--|-------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 неделя после индукции хРТПХ | | | | |
| Лейкоциты ($\times 10^6/\text{мл}$) | 19,9 14,7-21,2 | 8,6* 6,9-10,5 | 11,8** 10,0-14,5 | 10,4* 8,0-13,0 |
| Лимфоциты ($\times 10^6/\text{мл}$) | 14,6 12,2-16,1 | 6,7* 4,4-9,7 | 9,2* 7,0-10,5 | 7,3* 6,4-10,0 |
| 2 недели после индукции хРТПХ | | | | |
| Лейкоциты ($\times 10^6/\text{мл}$) | 18,3 14,0-20,5 | 12,1* 8,5-16,75 | 13,9 14,5-17,0 | 11,1* 7,5-13,5 |
| Лимфоциты ($\times 10^6/\text{мл}$) | 14,5 8,7-15,2 | 7,9* 6,4-11,7 | 10,0 8,3-11,5 | 8,5* 5,8-12,2 |
| 4 недели после индукции хРТПХ | | | | |
| Лейкоциты ($\times 10^6/\text{мл}$) | 16,9 14,0-19,0 | 18,9 12,0-17,5 | 17,8 11,2-21,5 | 15,8 14,5-17,0 |
| Лимфоциты ($\times 10^6/\text{мл}$) | 14,9 10,7-15,6 | 13,9 10,3-15,7 | 14,7 8,4-16,5 | 13,7 12,5-14,3 |

* - по сравнению с контролем, # - по сравнению с хРТПХ.

Влияние трансфузии сингенных клеток на частоту развития аутоиммунной патологии, индуцированной хронической РТПХ

Существует предположение, что трансплантация сингенных лимфоцитов в ситуации их выраженного снижения, восполняя лимфоцитарный пул в организме, может обрывать процесс ГП и тем самым не допускать срыва толерантности и развития аутоиммунного расстройства [Jang E, 2006]. На основании результатов данной работы и сделанного предположения о важной патогенетической роли ГП в развитии аутоиммунного процесса у *lupus*-реципиентов мышам после индукции хРТПХ для предупреждения ГП и формирования аутоиммунного гломерулонефрита дополнительно вводили сингенные спленоциты еженедельно трехкратно в дозе $40 \cdot 10^6$. Однако такой сингенный перенос привёл к неожиданному результату: сингенная трансфузия не купировала лимфопению, а частота развития *lupus*-нефрита возросла с 54% до 75% ($n=25$; $p<0,01$). Для выяснения возможных причин такого эффекта исследовали влияние введения сингенных спленоцитов интактным животным. Оказалось, что трансфузия сингенных спленоцитов хотя не вызывает таких резких колебаний уровня лейкоцитов, как трансплантация полуаллогенных клеток, но также приводит к выраженной лим-

фонении: наблюдается снижение числа лимфоцитов на 36% от уровня интактных животных (по сравнению со снижением на 65% - после индукции хРТПХ).

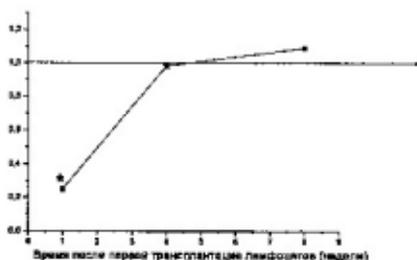


Рис. 8. Проллиферативная активность клеток костного мозга у мышей после трансплантации сингенных клеток

Данные представлены относительно значений контроля, принятых за 1.

* - различия между опытной и контрольной группами достоверны, контрольная группа - $n=20$; в группе с сингенным переносом каждая точка представлена средними значениями $n=4$, $p<0,05$.

Поскольку перенос сингенных лимфоцитов интактным животным приводит к снижению пролиферативной активности клеток-предшественников в костном мозге (рис. 8), можно предположить, что подобный эффект сингенного переноса лимфоцитов при хРТПХ может способствовать гомеостатической пролиферации клеток и обуславливать увеличение частоты развития аутоиммунного поражения почек.

Таким образом, дополнительное введение сингенных клеток на ранних стадиях хРТПХ не нормализует лимфопению, но вызывает изменения кроветворения, способствующие её поддержанию и, таким образом, может усугублять и/или пролонгировать лимфопению и усиливать гомеостатическую пролиферацию.

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что процесс гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов, обнаруженный нами при хРТПХ, тесно связан с патогенезом аутоиммунного гломерулонефрита, возникающего при развитии этой реакции по Th2-зависимому варианту.

ВЫВОДЫ

1. Хроническая реакция «трансплантат против хозяина», индуцированная в полуллогенной системе DBA/2→(C57BL/6хDBA/2)F1 и приводящая к аутоиммунному поражению почек, на ранних этапах сопровождается снижением количества лимфоцитов - необходимым условием включения процесса гомеостатической пролиферации.
2. Ранние этапы развития хронической РТПХ сопровождаются возрастанием концентрации IL-7 в периферической крови реципиентов, который остается на

повышенном уровне у *lupus*-мышей с развивающимся аутоиммунным гломерулонефритом.

3. У реципиентов с аутоиммунным гломерулонефритом, индуцированным хронической РТПХ, наблюдается увеличение в селезенке количества Т-клеток с фенотипом клеток памяти CD4⁺CD45RB^{low} и CD8⁺CD45RB^{low}, что характерно для гомеостатической пролиферации лимфоцитов. Анализ длины теломерных районов ДНК не выявил их укорочения у *lupus*-реципиентов по сравнению с контролем.

4. Введение дегидроэпандростерона сульфата и мурамилдипептида, действующих оппозитно на формирование аутоиммунной патологии, по-разному влияет на уровень лимфопении у реципиентов: мурамилдипептид, увеличивающий частоту возникновения гломерулонефрита, усиливает лимфопению по сравнению с дегидроэпандростерон сульфатом, снижающим частоту развития поражения почек. Трансфузия сингенных спленоцитов на ранних стадиях развития хронической РТПХ приводит к усилению лимфопении и увеличению частоты развития аутоиммунной патологии.

5. Характер изменения иммунных параметров у реципиентов с аутоиммунным поражением почек - лимфопения на ранних стадиях, возрастание уровня IL-7 и количества Т-клеток с фенотипом клеток памяти - свидетельствует о том, что гомеостатическая пролиферация является одной из характеристик аутоиммунного процесса, индуцированного хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6xDBA/2)F1.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кудашева О.Т., Гойман Е.В., Лыков А.П., Колесникова О.П., Козлов В.А. Влияние препаратов, изменяющих соотношение Th1/Th2, на частоту развития клинических вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2005. - №9(140). - С.325-327.
2. Ненашева Е.В., Гойман Е.В. Роль антител к ДНК в формировании гломерулонефрита при хронической реакции трансплантат против хозяина у мышей. // *Цитокины и воспаление*. - 2005. - Т.4. - №3. - С.141.
3. Ткачев В.О., Ненашева Е.В., Гойман Е.В., Вольский Н.Н., Кудашева О.Т., Колесникова О.П. Уровень аутоантител к ДНК и метаболическая активность полиморфно-ядерных лейкоцитов в динамике хронической реакции трансплантат против хозяина. // *Иммунология*. - 2006. - Т. 27, №2. - С. 98-101.
4. Ткачев В.О., Гойман Е. В., Лыков А. П., Кудашева О. Т., Колесникова О. П. Показатели гемопоэза в динамике развития хронической реакции трансплантат против хозяина. // *Иммунология*. - 2006. - Т.26, №3. - С. 168-171.

5. Гойман Е.В., Ненашева Е.В., Майбородин И.В., Кудасва О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. Коррекция аутоиммунной патологии переносом клеток сингенного костного мозга в экспериментальной модели. // Омский научный вестник. - 2007. - №3(61). - С.20-22.
6. Гойман Е.В., Кудасва О.Т., Ильина Н.А., Кожевников В.С., Колесникова О.П., Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация как механизм развития аутоиммунного процесса при хронической РТПХ. // Российский иммунологический журнал. -2008.-Т.2(11).-№2-3.-С.231.
7. Гойман Е.В., Кудасва О.Т., Ильина Н.А., Кожевников В.С., Колесникова О.П., Козлов В.А. Процессы гомеостатической пролиферации в патогенезе хронической РТПХ. // Сибирский медицинский журнал. - 2008.-№3.-С.91.
8. Гойман Е.В., Гаврилова Е.Д., Кудасва О.Т., Колесникова О.П. Уровень IgE в динамике развития разных вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина. // Вестник уральской медицинской академической науки.- 2009.- №2/1.-С.27-28.
9. Гойман Е.В., Кудасва О.Т., Ильина Н.А., Борисов В.И., Кожевников В.С., Колесникова О.П., Козлов В.А. Процессы гомеостатической пролиферации в патогенезе аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2010.-Т.149.-№ 1.-С. 60-63.
10. Гойман Е.В., Ткачев В.О., Кудасва О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. Связь лимфопении с развитием аутоиммунного процесса при хронической РТПХ. //Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири».-2010.-С.16-18.
11. Кудасва О.Т., Гойман Е.В., Ненашева Е.В., Майбородин И.В., Колесникова О.П., Козлова В.А. Коррекция аутоиммунного гломерулонефрита у экспериментальных животных летальным облучением и переносом клеток сингенного костного мозга. // Медицинская иммунология.-2010.-12(3).-С.191-198.
12. Гойман Е.В., Борисов В.И., Кудасва О.Т., Козлов В.А. Анализ длины теломерных районов ДНК у мышей при хронической РТПХ. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири».-2011.-С.47-49.
13. Гойман Е.В., Борисов В.И., Кудасва О.Т., Козлов В.А. Оценка длины теломерных районов ДНК у мышей при хронической РТПХ. // Вестник уральской медицинской академической науки.- 2011.- №2/1.-С.27-28.
14. Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Tkachev V.O., Volsky N.N., Perminova O.M., Gavrilova E.D., Kozlov V.A. The Experimental Model of the Autoimmune Glomerulonephritis Induced by the Chronic Graft versus Host Reaction. // An Update on Glomerulopathies - Etiology and Pathogenesis. Ed. Sharma Prabhakar. ISBN: 978-953-307-388-0. Rijeka: InTech.- 2011. - P.49-86.

Подписано к печати 11.11.2011
формат - 60x84 1/16, Усл. печ. л. 1

Бумага: офсетная Печать: трафаретная
Тираж: 100 экз. Номер заказа № 339
Типография ООО «ЮГУС-ПРИНТ», ИНН 5402467637,
г. Новосибирск, ул. Залесского, 4