

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 616-092:612.6.02.017.1]-092.9

В. А. Козлов, О. Т. Кудаева, О. П. Колесникова, И. В. Сафронова,
П. П. Лактионов, Е. Ю. Рыкова, Л. А. Обухова**ТН1- И ТН2-ЗАВИСИМЫЕ ВАРИАНТЫ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ
ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА**

ГУ НИИКИ СО РАМН, Новосибирск

Индукция хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) у генетически однородных реципиентов (C57BL/6 × DBA/2)_{F₁} путем введения $50 \cdot 10^6$ лимфоидных клеток родительской линии DBA/2 внутривенно двукратно с интервалом 5 дней приводит к развитию у части реципиентов аутоиммунной патологии — люпусподобного нефрита. Группы мышей, различающиеся по клиническим проявлениям хронической РТПХ (наличие или отсутствие поражения почек), характеризуются различной картиной иммунологических нарушений. Изучение параметров иммунной системы у реципиентов показало, что развитие хронической РТПХ в данной полуаллогенной системе может идти преимущественно по Th1-зависимому или Th2-зависимому типу. В случае развития хронической РТПХ Th2-типа наблюдаются выраженная поликлональная пролиферация В-лимфоцитов, депрессия клеточного и гуморального иммунного ответа. При хронической РТПХ Th1-типа процессы активации В-клеток менее выражены, наблюдается угнетение гуморальных, но не клеточных, реакций и отсутствуют выраженные проявления поражения почек. В пользу предположения о развитии Th1- и Th2-зависимых вариантов хронической РТПХ свидетельствует изменение соотношения подклассов иммуноглобулинов в опытных группах: мыши pr^- характеризуются сниженным соотношением IgG1/IgG2a, тогда как у мышей pr^+ наблюдается его увеличение, возрастающее по мере развития заболевания.

Induction of chronic graft-versus-host reaction (GVHR) in genetically homogeneous (C57BL/6 × DBA/2)_{F₁} recipients by 2 intravenous injections of $50 \cdot 10^6$ parental DBA/2 lymphoid cells at 5-day interval led to development of an autoimmune disease (lupus-like nephritis) in some recipients. Groups of mice differing by clinical manifestations of chronic GVHR (with and without renal involvement) were characterized by different immune disorders. Study of immunity parameters in recipients showed that chronic GVHR in this semiallogenic system developed mainly by the Th1 or Th2-dependent type. Development of type Th2 chronic GVHR is associated with pronounced polyclonal proliferation of B lymphocytes and depression of cellular and humoral immune response. In type Th1 chronic GVHR B-cell activation is less manifest, humoral but not cellular reactions are suppressed, and there are no symptoms of renal involvement. Changed ratio of immunoglobulin subclasses in experimental groups confirmed the hypothesis about the development of Th1- and Th2-dependent variants of GVHR: pr^- mice are characterized by reduced IgG1/IgG2a ratio, while in pr^+ mice this ratio increases with the disease progress.

Развитие реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) в полуаллогенной системе (перенос лимфоидных клеток от родителя гибридам первого поколения) может приводить как к острой РТПХ, сопровождающейся анемией, лимфопенией и гипогаммаглобулинемией, так и к ее хронической форме, для которой характерна лимфопролиферация [15]. Реакция зависит от генетических различий между родителем и гибридом, количества донорских клеток, их фенотипа [21]. В обоих случаях активируются донорские Т-лимфоциты, которые реагируют на различия по антигенам гистосовместимости. При этом в случае острой реакции стимулируются Th1 и развивается цитотоксическая клеточная реакция, направленная против тканей реципиента и приводящая к его гибели, а при хронической реакции активируются Th2, отсутствуют проявления цитотоксичности, происходит поликлональная стимуляция В-лимфоцитов реципиента и может формироваться аутоиммунная патология [9, 12].

Перенос здоровым интактным гибридам (C57BL/6 × DBA/2)_{F₁} (BDF) лимфоидных клеток C57BL/6 приводит к развитию острой РТПХ, тогда как лимфоциты DBA/2 вызывают хроническую реакцию [19, 23]. Ранее нами было показано, что при индукции хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2- > (C57BL/6 × DBA/2)_{F₁} аутоиммунная патология — люпусподобный гломеруло-нефрит — развивается только у части гибридов, что

подтверждается результатами морфологического изучения почечной ткани [3, 4]. Представляло интерес охарактеризовать иммунный статус мышей BDF, различающихся по клиническим проявлениям хронической РТПХ, что и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы. В опытах использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов (C57BL/6 × DBA/2)_{F₁} в возрасте 2 мес, полученных из питомника "Столбовая" (Москва). Хроническую РТПХ вызывали переносом $50 \cdot 10^6$ лимфоидных клеток мышей линии DBA/2 ($5 \cdot 10^6$ клеток лимфатических узлов, $15 \cdot 10^6$ тимоцитов и $30 \cdot 10^6$ спленоцитов) реципиентам — гибридам C57BL/6 × DBA/2 внутривенно двукратно с интервалом 5 дней [13]. О развитии гломерулонефрита судили по стойкому появлению белка в моче (белок определяли калориметрически с красителем Cumassi blue с помощью "Titertec Multiskan", 570 нм; калибровочная кривая по BSA 100—1000 мкг/мл; более 3 мг/мл не менее 3 раз подряд при еженедельном тестировании), что коррелирует с морфологическим подтверждением болезни [3]. Формировали группы животных со стойкой протеинурией (pr^+) и без протеинурии — с содержанием белка в моче на уровне контрольной группы (pr^-).

Уровень клеточных и гуморальных иммунных реакций оценивали по ответу на Т-зависимый антиген — эритроциты барана (ЭБ); для реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) реципиентов предварительно сенсибилизировали в дозе $2,5 \cdot 10^7$ ЭБ внутрибрюшинно, разрешающую дозу $5 \cdot 10^8$ ЭБ вводили в подушечку задней лапы; для определения количества антителообразующих клеток (IgM-АОК и IgG-АОК) реципиентов иммунизировали внутривенно в дозе $2 \cdot 10^8$ ЭБ по стандартным методикам [10, 24]. Реакцию ГЗТ оценивали с помощью индекса реакции (ИР), который рассчитывали как отношение разницы между величинами отека опытной (введение ЭБ) и контрольной (введение растворителя) лап к величине отека контрольной лапы и выражали в процентах.

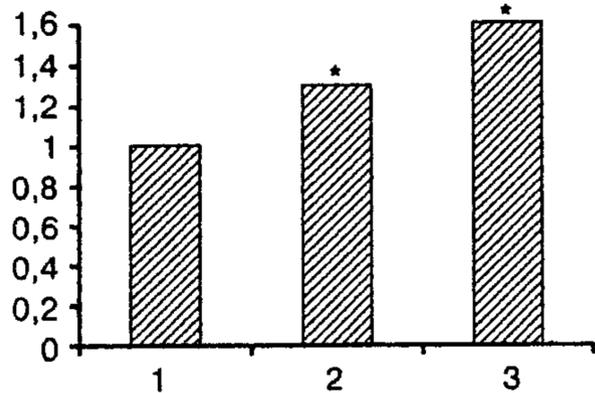


Рис. 1. Количество клеток селезенки мышей (C57BL/6xDBA/2)F₁ после переноса лимфоидных клеток DBA/2.

По оси ординат — число клеток селезенки относительно контроля. 1 — контроль (n = 33), 2 — rg⁻ (n = 28), 3 — rg⁺ (n = 18). Звездочка — p < 0,05 по сравнению с контролем.

Содержание IgG и подклассов IgG1 и IgG2a в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного варианта метода иммуноферментного анализа [5] — моноклональные антитела к IgG мыши и пероксидазный конъюгат "БиоС" (Новосибирск); субстрат оксифенилендиамин ("Sigma"); планшеты Е. I. А. ("Linbro"), "Titertec Multiskan", 492 нм.

Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса проводили по стандартным методикам [1, 6].

Контрольная группа состояла из животных того же генотипа, пола и возраста, что и реципиенты. Для анализа полученных результатов, учитывая характер распределения изучаемых признаков, далекий от нормального, использовали методы непараметрической статистики [2].

Результаты и обсуждение. Характерной особенностью хронической РТПХ является увеличение количества клеток селезенки [21]. Изучение этого показателя у реципиентов показало, что развитие хронической РТПХ наблюдается в обеих группах; реакция более выражена в группе rg⁺ (рис. 1).

Результаты морфометрического исследования тимуса (M ± m)

Показатель	1. Контроль (n = 5)	2. Pr ⁺ (n = 4)	3. Pr ⁻ (n = 5)	p
Относительные объемы (V _с), %				
Корковое вещество	50,5±2,53	42,6±3,58	54,2±2,17	p ₂₋₃ <0,05
Мозговое вещество	36,1±2,43	35,6±5,14	25,8±2,27	p ₁₋₃ <0,05
Строма	6,3±1,5	4,7±0,2	7,9±1,4	—
ВВП	6,5±1,2	15,8±1,6	11,0±1,6	p ₁₋₂ <0,01
Железистые образования	0,65±0,18	1,32±0,24	1,1±0,24	—
Количество клеток на стандартной площади 22 500 мкм ²				
Субкапсулярная зона коры:				
макрофаги	9,4±0,75	18,5±1,04	21,0±2,24	p ₁₋₂ <0,01 p ₁₋₃ <0,01
клетки с пикнотическими ядрами	11,2±2,2	13,5±1,32	20,4±3,72	
клетки с фигурами митозов	8,0±1,2	7,5±0,65	11,2±1,88	
Внутренняя зона коры:				
макрофаги	1,54±0,2	3,25±0,63	3,4±0,51	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,01
клетки с пикнотическими ядрами	7,0±0,89	6,25±0,48	8,0±1,2	
клетки с фигурами митозов	4,19±0,49	4,75±0,63	7,8±1,6	

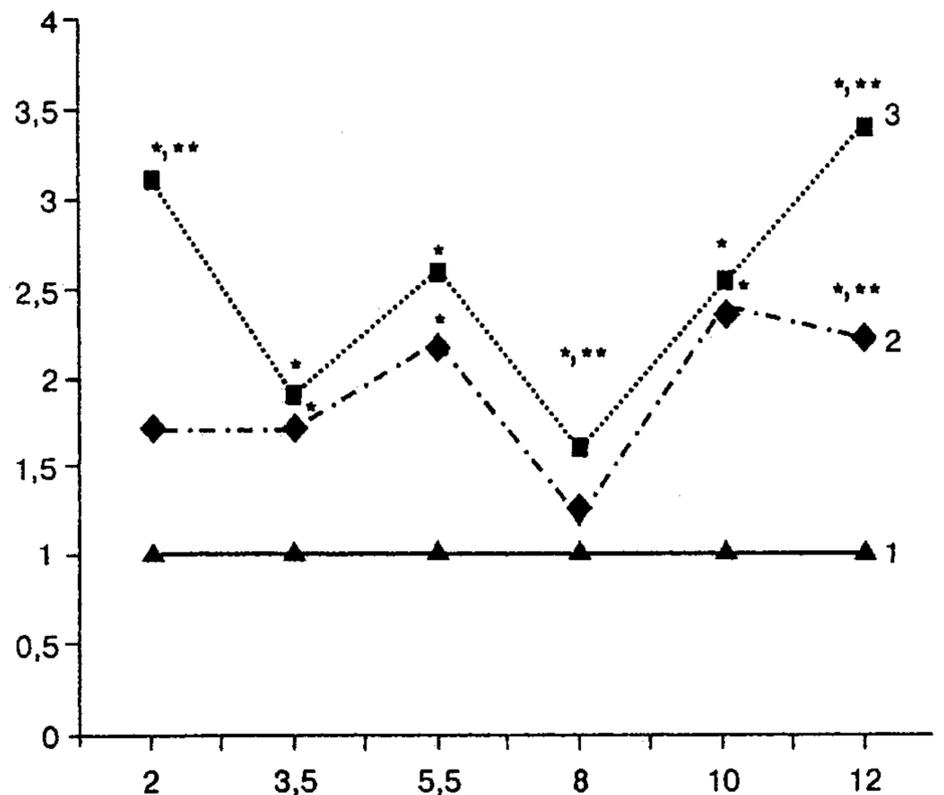


Рис. 2. Уровни иммуноглобулинов в периферической крови мышей B6D2F₁ в динамике развития хронической РТПХ.

По оси абсцисс — срок после индукции хронической РТПХ (в нед), по оси ординат — концентрация IgG относительно контроля. 1 — контроль (n = 15), 2 — rg⁻ (n = 15), 3 — rg⁺ (n = 10). Одна звездочка — p < 0,01 по сравнению с контролем, две — p < 0,05 при сравнении показателей в группах (rg⁻ и rg⁺).

Известно, что при острой РТПХ уже в ранние сроки наблюдается деструкция тимуса вплоть до его полной атрофии, так что на поздних стадиях лимфоидная ткань тимуса практически не выявляется. При хронической форме РТПХ изменения тимуса не так значительны [14]. Морфометрическое исследование тимуса показало, что в обеих группах животных структура коры и мозгового вещества сохранена, плотность расположения лимфоидных клеток мало отличается от контроля. В тимусе у мышей rg⁺ достоверно увеличен относительный объем внутридольковых периваскулярных пространств (ВПП), их клеточный состав представлен преимущественно плазматическими клетками разной степени зрелости. У всех животных данной группы в ВПП наблюдали вторичные лимфоидные узелки с герминативными центрами. Данные морфологические изменения в тимусе характерны для аутоиммунных заболеваний, хотя и не являются для них специфическими [7]. Изменения ткани тимуса не имеют такого выраженного характера, как атрофия при остром варианте РТПХ (см. таблицу).

Один из признаков хронической РТПХ — поликлональная активация В-клеток, следствием которой являются высокий уровень IgG в крови и продукция аутоантител [21]. Определение содержания IgG в периферической крови в динамике после индукции РТПХ показало, что наблюдается повышение уровня IgG у реципиентов в обеих группах, но у мышей rg⁺ увеличение содержания IgG начинается раньше и достигает больших значений (рис. 2).

Соотношение подклассов иммуноглобулинов IgG1/IgG2a также различается в двух опытных группах: через 6 нед после индукции РТПХ, в начале развития заболевания у мышей rg⁺ данный показатель составляет 3,4, тогда как у мышей rg⁻ он

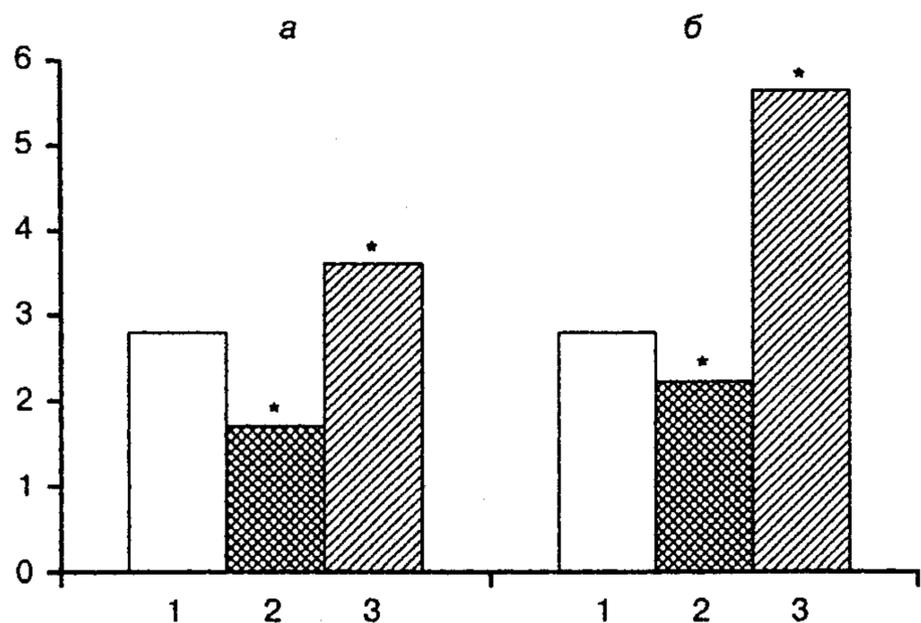


Рис. 3. Соотношение подклассов иммуноглобулинов IgG/IgG2a в сыворотке крови мышей B6D2F₁ после индукции хронической РТПХ.

По оси ординат — соотношение IgG1/IgG2a. 1 — контроль (n = 8), 2 — rg⁻ (n = 8), 3 — rg⁺ (n = 8). а — 1 мес, б — 6 мес. Звездочка — p < 0,05 при сравнении показателей в группах rg⁻ и rg⁺.

равен 1,6. В дальнейшем преобладание подкласса IgG1 у мышей с протеинурией становится еще более выраженным (рис. 3).

Определение количества IgM-АОК и IgG-АОК в селезенке реципиентов на пике иммунного ответа, свойственного этому генотипу, выявило значительное снижение гуморального иммунного ответа (рис. 4 и 5). Достоверное снижение количества IgM-АОК и IgG-АОК наблюдается у всех реципиентов; у мышей без протеинурии депрессия антителообразования более глубокая: число IgG-АОК на пике ответа у реципиентов без протеинурии свидетельствует о практически полном подавлении гуморального ответа.

У животных с протеинурией (группа rg⁺) реакция ГЗТ на тот же антиген (ЭБ) достоверно снижена; ответ в группе мышей rg⁻ не отличается от такового в контроле (рис. 6). Таким образом, первичный гуморальный иммунный ответ на Т-зависимый антиген оказался подавленным у животных в

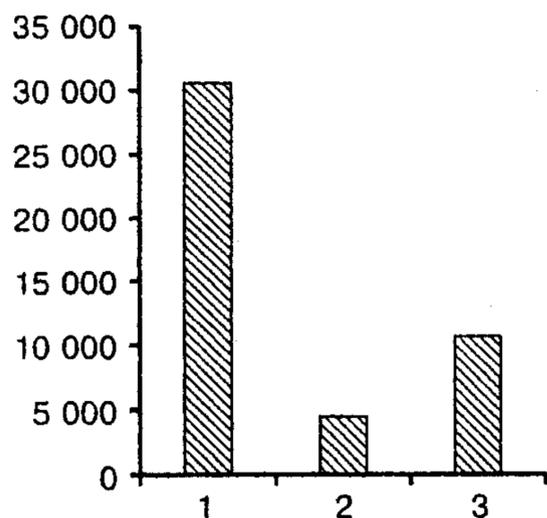


Рис. 4. Количество IgM-АОК в селезенке мышей B6D2F₁ после индукции хронической РТПХ.

По оси ординат — количество IgM-АОК. 1 — контроль (n = 20), 2 — rg⁻ (n = 20), 3 — rg⁺ (n = 18).

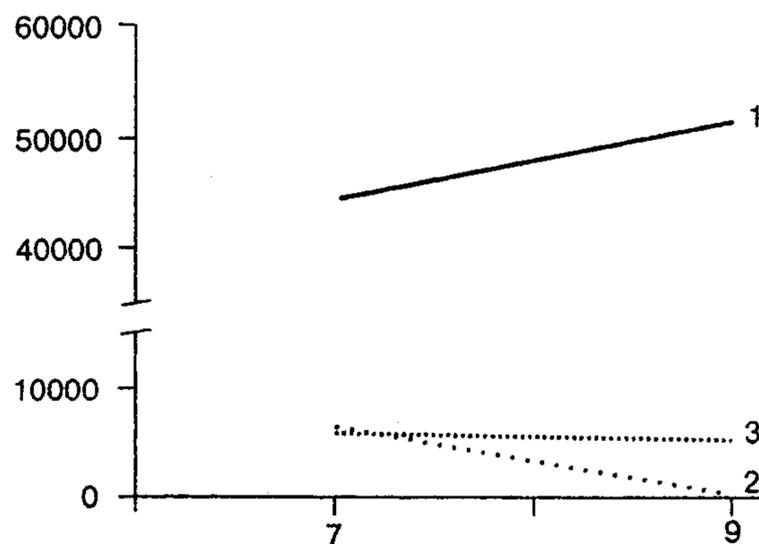


Рис. 5. Количество IgG-АОК в селезенке мышей B6D2F₁ после индукции хронической РТПХ.

По оси абсцисс — срок после иммунизации ЭБ (в сут), по оси ординат — количество IgG-АОК. 1 — контроль (n = 12), 2 — rg⁻ (n = 17), 3 — rg⁺ (n = 7).

обеих группах, при этом депрессия более выражена у мышей в группе rg⁻; ответ клеточного звена иммунитета снижен только в группе rg⁺.

В настоящее время показано, что при переносе гибридам BDF лимфоидных клеток C58BL/6 или DBA/2, несмотря на развитие соответственно острой или хронической РТПХ, в обоих случаях реакция начинается с распознавания CD4⁺-клетками донора аллоантигенов хозяина, продукции интерлейкина (ИЛ)-2 и возрастания уровня цитокинов, свойственных Th2 (ИЛ-4 и ИЛ-10), что приводит к активации В-лимфоцитов [17, 22]. Последующее расхождение двух типов РТПХ сопровождается в случае острой реакции экспансией CD8⁺-клеток донора, направленных против аллоантигенов хозяина и стимулирующих CD4⁺ донорского происхождения к синтезу γ-интерферона (γ-ИФН). Активация CD8⁺-клеток донора в дальнейшем приводит к стимуляции цитотоксических лимфоцитов, что ограничивает гиперактивацию В-лимфоцитов реципиента. Заканчивается острая РТПХ характерной картиной: лимфопения, атрофия тимуса, глубокая иммунодепрессия как гуморального, так и

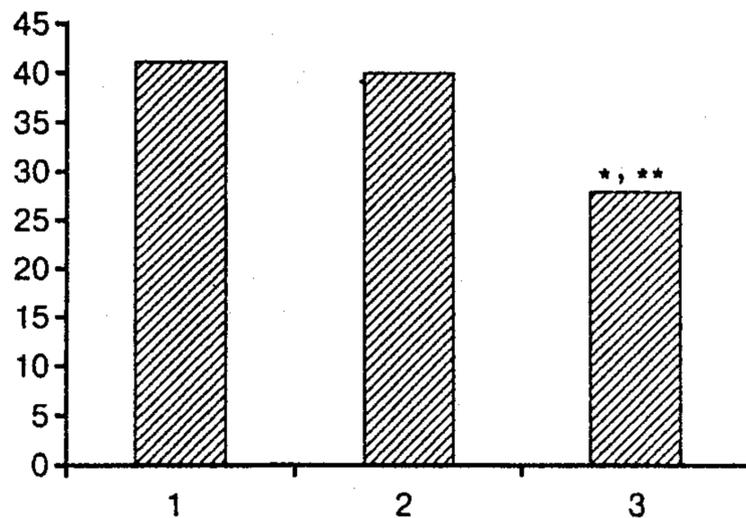


Рис. 6. Выраженность реакции ГЗТ у мышей B6D2F₁ после индукции хронической РТПХ.

По оси ординат — ИР (индекс реакции). 1 — контроль (n = 28), 2 — rg⁻ (n = 19), 3 — rg⁺ (n = 15). Одна звездочка p < 0,05 по сравнению с контролем, две — p < 0,05 при сравнении показателей в группах rg⁻ и rg⁺.

клеточного звена иммунитета вследствие деструкции лимфоидной ткани хозяина. Недостаточная активность CD8⁺-лимфоцитов вызывает менее выраженные проявления острой РТПХ и даже ее переход в хроническую форму [19]. При развитии реакции по хроническому типу не происходит достаточного образования цитотоксических CD8⁺-клеток, специфичных к аллоантигенам хозяина, и ограничения поликлональной активации В-лимфоцитов реципиента, что приводит к гипергаммаглобулинемии, образованию аутоантител и развитию аутоиммунной патологии. Таким образом, развитие острой формы РТПХ связано с переключением активированных донорских клеток на Th1-тип ответа, тогда как хроническая РТПХ связана со стимуляцией Th2-донорских клеток и сопровождается лимфопролиферативными процессами в основном со стороны В-лимфоцитов хозяина [23].

Перенос мышам D6D2F₁ лимфоидных клеток мышей DBA/2 индуцирует хроническую РТПХ, что обусловлено свойственным этой родительской линии низким числом прекурсоров цитотоксических CD8⁺-клеток [17, 21]. Несмотря на использование генетически однородных реципиентов и стандартные условия переноса, в наших опытах формируются два варианта иммунопатологического состояния, только один из которых сопровождается развитием аутоиммунного люпусподобного нефрита (группа rg⁺). Хотя оба варианта могут быть отнесены к хроническому типу, о чем свидетельствуют увеличение количества клеток в селезенке, поликлональная стимуляция В-лимфоцитов, отсутствие выраженной атрофии тимуса, выявляются четкие различия иммунных нарушений.

Так, показано, что наряду с лимфопролиферацией развитие хронической РТПХ сопровождается ингибцией иммунного ответа на Т-зависимые антигены [19, 20]. В настоящем исследовании также продемонстрировано значительное подавление иммунного ответа на ЭБ — Т-зависимый антиген, при этом в группе rg⁺ наблюдается снижение и клеточных, и гуморальных реакций, тогда как у животных другой группы (rg⁻) более выражено подавление продукции антител при сохраненном уровне клеточного ответа.

Известно, что Т-хелперы 1-го и 2-го типов обладают разной чувствительностью ко многим регуляторным факторам организма (кортикостероиды, норадреналин, простагландины и др.) [8, 11, 16]. Возможно, различия в уровнях таких биологически активных веществ в организме реципиентов при индукции РТПХ приводят к преимущественной активации Т-хелперов разных классов, что может направлять течение хронической РТПХ по двум разным путям в зависимости от преобладающего соотношения Th1/Th2 в ключевой момент развития реакции. Это, вероятно, приводит к двум вариантам развития хронической РТПХ: с преимущественным влиянием Th2-клеток (группа rg⁺ со сниженным клеточным ответом) или Th1-клеток (группа rg⁻ с нормальным клеточным ответом). В пользу этого предположения свидетельствует изменение соотношения подклассов иммуноглобулинов в опытных группах. Соотношение IgG1/IgG2a является интегральным показателем преобладаю-

щей активности Th1 или Th2: Th1 стимулируют продукцию IgG2a, Th2 индуцируют синтез IgG1 [18]. Таким образом, мыши rg⁻ с более низким соотношением IgG1/IgG2a характеризуются сдвигом соотношения в сторону Th1, тогда как у мышей rg⁺ с преимущественным содержанием IgG1, по-видимому, более активны Th2.

Выводы

1. Показано, что индукция РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2- > (C57BL/6 × DBA/2)F₁ может приводить к развитию у генетически однородных реципиентов двух вариантов хронической реакции: Th1- и Th2-типа.

2. Развитие хронической РТПХ сопровождается клинико-иммунологическими нарушениями, при этом только в случае Th2-варианта формируется аутоиммунная патология — люпусподобный нефрит.

3. Модель индукции разных вариантов хронической РТПХ может использоваться для изучения механизмов формирования иммунопатологических состояний и тестирования препаратов, влияющих на баланс Th1/Th2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. — М., 1990.
2. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — М., 1978.
3. Колесникова О. П., Кудалева О. Т., Логинов М. В. и др. // Вестн. АМН. — 1991. — № 12. — С. 13—16.
4. Кудалева О. Т., Колесникова О. П., Сафронова И. В. // Ланцетология. — 1993. — № 1. — С. 69.
5. Кэтли Д. Антитела. В 2-х кн. — М., 1991. — Кн. 2.
6. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. — М., 1996.
7. Харченко В. П., Саркисов Д. С., Ветшев П. С. и др. Болезни вилочковой железы. — М., 1998.
8. Betz M. // J. Immunol. — 1991. — Vol. 146, N 1. — P. 108—113.
9. Dubey C., Bellon B., Druet P. // Eur. Cytokine Net. — 1991. — Vol. 2, N 3. — P. 147—152.
10. Cunningham A. J. // Nature. — 1965. — Vol. 207. — P. 1106—1107.
11. Daynes R. A., Araneo B. S. // Eur. J. Immunol. — 1989. — Vol. 19, N 12. — P. 2319—2325.
12. Ferrara J. L. // J. Hematother. Stem. Cell. Res. — 2000. — Vol. 9, N 3. — P. 299—306.
13. Kimura K., Shimada K., Kanai Y. // Clin. Exp. Immunol. — 1987. — Vol. 69, N 2. — P. 385—393.
14. Krenger W., Rossi S., Piali L., Hollanger G. A. // Blood. — 2000. — Vol. 96, N 1. — P. 347—354.
15. Mann A. R., Schiff D., Jetzt A. E. et al. // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1998. — Vol. 89, N 3. — P. 260—270.
16. Mason D. // Immunol. Today. — 1991. — Vol. 12, N 1. — P. 57—60.
17. Rus V., Svetic A., Nguyen P. et al. // J. Immunol. — 1995. — Vol. 155, N 5. — P. 2396—2406.
18. Shapper C. M., Paul W. E. // Science. — 1987. — Vol. 236, N 4804. — P. 944—947.
19. Tschetter J. R., Mozes E., Shearer G. M. // J. Immunol. — 2000. — Vol. 165, N 10. — P. 5987—5994.
20. Via C. S., Sharrow S. O., Shearer G. M. // Ibid. — 1987. — Vol. 139, N 6. — P. 1840—1849.
21. Via C. S., Shearer G. M. // Immunol. Today. — 1988. — Vol. 9. — P. 207—213.
22. Via C. S. // J. Immunol. — 1991. — Vol. 146, N 8. — P. 2603—2609.
23. Williamson E., Garside P., Bradley J. A., Mowat A. M. // Ibid. — 1996. — Vol. 157, N 2. — P. 689—699.
24. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T. et al. // Immunology. — 1979. — Vol. 38, N 3. — P. 5477—583.