

На правах рукописи

**КУДАЕВА**  
Ольга Тимофеевна

**ТН1/ТН2-ПОЛЯРИЗАЦИЯ  
КАК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ  
РАЗНЫХ ВАРИАНТОВ ИММУНОПАТОЛОГИИ  
ПРИ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА».**

14.00.36 аллергология и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Новосибирск – 2005

Работа выполнена в ГУ Научно-исследовательском институте  
клинической иммунологии СО РАМН

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН **В.А.Козлов**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

**А.И.Аугеншлюс**

доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАМН

**Л.А.Трунова**

доктор медицинских наук, профессор

**А.А. Ярилин**

Ведущая организация **Российский государственный медицинский  
университет МЗ РФ, Москва**

Защита состоится **8 декабря** 2005 г. в 14 час. на заседании  
диссертационного совета Д 001.001.01 при ГУ Научно-  
исследовательском институте клинической иммунологии СО РАМН  
(630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14).

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

Автореферат разослан 29 сентября 2005г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук  **И.А.Орловская**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы.

Современные достижения в области биологических наук, в частности, клеточной и молекулярной биологии и молекулярной генетики, позволили понять многие процессы, лежащие в основе функционирования иммунной системы, и тонкие механизмы их регуляции. Интенсивное исследование открытых в 1986 году среди мышинных CD4<sup>+</sup>T-клеток, а затем среди T-лимфоцитов человека двух субпопуляций T-хелперов, которые продуцируют разные комплексы цитокинов и оказывают оппозитное влияние на основные звенья иммунного ответа [Mosmann T.R. et al., 1986; Del Prete G.F. et al., 1991], привело к формированию концепции поляризации иммунного ответа, рассматривающей баланс Th1/Th2 в качестве базисного параметра регуляции иммунных процессов. [Cher D.J. et Mosmann T.R., 1987; Mosmann T.R. et Sad S., 1996; Allen J.E. et Maizels R.M., 1997; O'Gor D. et al., 2003]. Применение этой парадигмы при изучении регуляции иммунитета как в нормальных физиологических условиях, так и при иммунопатологических состояниях оказалось плодотворным и сегодня широко используется при изучении таких процессов, как бактериальные и вирусные инфекции, аллергические заболевания, иммунные реакции при канцерогенезе, аутоиммунные расстройства, иммунные конфликты при беременности [Fresno M. et al., 1997; Chaouat G. et al., 2003; Wilczynski J.R., 2005]. Хотя не все известные на сегодняшний день экспериментальные факты и клинические наблюдения идеально укладываются в эту концепцию, её актуальность и применимость для решения современных проблем регуляции иммунитета не вызывают сомнений.

Одним из процессов, в реализации которых Th1/Th2-баланс играет решающую роль, является реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) - иммунная реакция клеточного типа, развивающаяся при трансплантации зрелых T-лимфоцитов неспособному к их отторжению хозяину в условиях тканевой несовместимости донора и реципиента [Шевелёв АС., 1976]. Описанная и изученная изначально как лабораторный феномен, в настоящее время РТПХ активно исследуется в клинике, так как представляет собой тяжёлое осложнение, которое возникает при пересадках аллогенного костного мозга, являющихся составной частью комплексной терапии при радиационных поражениях, онкологических и аутоиммунных заболеваниях [Parkman R., 1993; Murphy W.J., Blazar B.R., 1999; Ferrara J.L., 2000]. Кроме того, в настоящее время РТПХ широко применяется для моделирования в

эксперименте аутоиммунных заболеваний человека, что позволяет изучать механизмы формирования иммунопатологических процессов [Okamoto I. et al., 1999; Iwasaki T. et al., 2000; Kolesnikova O.P. et al., 2001]. До последнего времени было принято считать, что острая РТПХ является преимущественно Th1-зависимым процессом, тогда как при хронической РТПХ происходит активация Th2-клеток донора [Krenger W., Ferrara J.L., 1996; Abdallah A.N. et al., 1997; Shustov A. et al., 2000]. Однако нами было обнаружено, что хроническая РТПХ может протекать в различных вариантах, клинические проявления которых предположительно связаны с разной степенью активации Т-хелперных субпопуляций [Кудаева О.Т. и др., 1992].

Основные достижения экспериментальной и клинической иммунологии последних десятилетий связаны с исследованиями генетических механизмов, лежащих в основе регуляции иммунных реакций. С помощью молекулярно-генетических и генно-инженерных методов убедительно показана генетическая детерминированность вида, направленности и интенсивности иммунных реакций, которыми организм отвечает на антигенные воздействия. В то же время само развитие этого направления в иммунологии, уделяющего основное внимание генетическим механизмам, ведёт к осознанию того факта, что хотя генотип, несомненно, является основой функционирования любых регуляторных механизмов, текущая физиологическая регуляция иммунитета не может осуществляться путём коррекции генотипа данного конкретного организма. Становится ясным, что не меньшую роль в детерминации особенностей протекания индивидуальных иммунных реакций должны играть эпигенетические механизмы, то есть долгосрочные, но обратимые изменения активности генов в процессе индивидуального развития организма, не связанные с изменением нуклеотидной последовательности ДНК, с помощью которых осуществляется целенаправленное сопряжение реакций иммунной системы с адаптационными процессами целостного организма [Vercelli D., 2004; Wilson C.B. et al., 2005].

Считается, что судьба развивающейся Th-клетки зависит от доминирования специфических транскрипционных факторов Th1- или Th2-дифференцировки, устанавливаемого комплексом внешних эпигенетических факторов [Glimcher L.H. et Murphy K.M., 2000; Wilson C.B. et al., 2002; Agnello D. et al., 2003]. В связи с этим выбор направления, в котором будут развиваться конкретные Th-клетки, находится под влиянием многочисленных факторов, связывающих реакции в иммунной системе с текущим состоянием целостного организма, среди которых в первую очередь нужно указать

гормональный фон, вегетативный статус, уровень активности центральной нервной системы [Козлов В.А. и др, 1982; Абрамов В.В., 1988; Rook G.A. et al., 1994; Elenkov I.J., 2004]. К числу важнейших параметров, определяющих состояние организма, относится и уровень двигательной активности, значение которой сформулировано в энергетическом правиле скелетных мышц и заключается в том, что особенности энергетики и соответственно уровень физиологических отклонений различных вегетативных систем организма в целом определяется состоянием скелетной мускулатуры [Аршавский И.А., 1982]. Несмотря на значительную вариабельность результатов, изучение влияния физических тренировок свидетельствует об их несомненном эффекте на иммунную систему [Першин Б.Б. и Кузьмин С.Н., 1994; Nieman D.C., 1996; Pedersen B.K. et al., 1998; Gleeson M. et al., 2004].

Таким образом, соотношение активностей Th1- и Th2-субпопуляций, контролирующее выбор варианта, по которому пойдет развитие иммунного процесса в каждом конкретном случае, определяется не только генотипом, но и обусловленными эпигенетическими механизмами изменениями в иммунной системе, сформировавшимися на предыдущих этапах онтогенеза. Это положение определило цель и задачи исследования.

### **Цель и задачи исследования.**

Целью настоящей работы было исследование роли Th1/Th2-соотношения как вероятного ключевого параметра иммунной системы, опосредующего эффект эпигенетических воздействий и определяющего направление развития иммунопатологического процесса при хронической РТПХ у генетически однородных животных.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить состояние иммунной системы реципиентов (функциональную активность клеток иммунной системы в опытах *in vitro* и *in vivo* и способность к гуморальному и клеточному иммунному ответу *in vivo*) в динамике развития хронической РТПХ с момента ее индукции до формирования клинически различающихся исходов.

2. Выяснить зависимость вариантов течения хронической РТПХ от преимущественной активации Th1- или Th2-субпопуляций, оцениваемой по соотношению подклассов иммуноглобулина G.

3. С помощью воздействий, стимулирующих активность Th1- или Th2-клеток, исследовать влияние Th1/Th2-баланса в фазе индукции РТПХ на развитие разных вариантов иммунопатологического процесса.

4. Изучить влияние половых и глюкокортикоидных гормонов на развитие вариантов хронической РТПХ.

5. Охарактеризовать состояние основных функциональных параметров иммунной системы (функциональную активность лимфоцитов в опытах *in vitro* и *in vivo* и способность к гуморальному и клеточному иммунному ответу *in vivo*) после регулярных физических тренировок различной продолжительности.

6. Исследовать влияние регулярных физических тренировок на частоту развития клинических вариантов хронической РТПХ.

**Научная новизна результатов исследования.**

Впервые показано, что в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6xDBA/2)F1 индукция хронической РТПХ, ранее рассматривавшейся как исключительно Th2-зависимая реакция, приводит у генетически однородных реципиентов в стандартных условиях опыта к развитию двух вариантов иммунного процесса: Th1- или Th2-зависимого типа.

Хроническая РТПХ Th1-зависимого типа характеризуется спленомегалией и гипергаммаглобулинемией при отсутствии атрофических изменений тимуса, резким подавлением IgM- и IgG-антителообразования в сочетании с нормальным клеточным ответом на T-зависимый антиген, а также преимущественной продукцией IgG2a по сравнению с IgG1.

Хроническая РТПХ Th2-зависимого типа характеризуется более значительными по сравнению с Th1-вариантом спленомегалией и гипергаммаглобулинемией при отсутствии атрофических изменений тимуса, супрессией как гуморального, так и клеточного ответа на T-зависимый антиген, преимущественной продукцией IgG1 по сравнению с IgG2a, а также формированием аутоиммунной патологии – люпус-подобного иммунокомплексного гломерулонефрита.

Получены новые данные о возможных механизмах развития у реципиентов Th1- или Th2-вариантов иммунопатологических состояний. Развитие Th1- варианта сопровождается значительным повышением спонтанной и LPS-стимулированной продукции IL-1 перитонеальными макрофагами реципиентов в начальные сроки после индукции хРТПХ, тогда как при Th2-варианте не происходит подъема продукции этого цитокина. Выявлена разная динамика образования антител к ДНК при Th1- и Th2-зависимых вариантах хРТПХ с пиком в более ранние сроки при Th2-варианте. Показано, что формирование аутоиммунного гломерулонефрита в данной модели не зависит от Ly1<sup>+</sup>В клеток. Установлено, что развитие хронической РТПХ у lupus-реципиентов сопряжено с поддержанием повышенного уровня

кортикостерона и более выраженным преобладанием продукции женских половых гормонов над мужскими по сравнению с nonlupus-мышами. Показано, что поражение почек при Th2-варианте имеет обратимый характер и корригируется летальным облучением с последующим восстановлением клетками сингенного костного мозга. Развивающийся иммунодефицит (супрессия иммунного ответа на T-зависимый антиген) при обоих вариантах имеет стойкий характер и не нормализуется летальным облучением с последующим восстановлением клетками сингенного костного мозга.

Установлена возможность модуляции течения хронической РТПХ агентами, изменяющими соотношение Th1/Th2 в индуктивную фазу реакции (первые 2 недели): введение веществ, активирующих Th1-клетки, снижает частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита; введение веществ, стимулирующих Th2-клетки, увеличивает частоту этого клинического варианта в экспериментальных группах. Показано, что подавление пролиферации гемопоэтических клеток-предшественников при хронической РТПХ снижает, а ее стимуляция увеличивает частоту формирования аутоиммунного гломерулонефрита.

Установлено, что регулярные физические тренировки умеренной интенсивности не вызывают значительных сдвигов в иммунной системе грызунов. Наблюдается достоверное, но не резкое снижение выраженности иммунных реакций. В то же время эффекты физических упражнений закономерно усиливаются при увеличении длительности тренировок, приводя к значительному подавлению функциональной активности лимфоцитов. Получены данные, свидетельствующие о поликлональной активации В-клеток на фоне регулярных физических упражнений различной длительности. Физические тренировки снижают частоту развития иммунокомплексного гломерулонефрита при индукции хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6xDBA/2)F1.

Обнаружено, что реакция иммунной системы организма на физические тренировки зависит от пола экспериментальных животных, тогда как изменения процессов кроветворения характеризуются однонаправленными эффектами.

#### **Научная и практическая значимость работы.**

На модели хронической РТПХ показано, что иммунопатологический процесс у генетически идентичных экспериментальных животных, находящихся в стандартных условиях, развивается по двум существенно различающимся клиническим вариантам, формирование которых связано с исходной

фенотипической разнородностью опытной группы, возникающей в результате эпигенетических воздействий таких факторов, как эндокринный статус и двигательная активность, на соотношение Th1/Th2 - ключевой внутрисистемный параметр, определяющий развитие хронической РТПХ по тому или иному варианту. Показано, что при определённых условиях активация Th1-клеток у мышей может приводить не к острой форме РТПХ, а к ранее не известному варианту хронической РТПХ, что расширяет представления о механизмах иммунопатологических процессов.

В совокупности, полученные в работе результаты представляют собой новое научное достижение, существенно меняя взгляд на развитие хронической РТПХ и теоретически обосновывая роль в этом процессе эпигенетических факторов, влияние которых опосредуется Th1/Th2- балансом в целостном организме.

Изученная в работе индукция хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→ (C57BL/6хDBA/2)F1 является адекватной лабораторной моделью для изучения механизмов формирования Th1/Th2-зависимых иммунопатологических состояний и тестирования препаратов, влияющих на соотношение Th1/Th2 в условиях *in vivo*.

Разработанный микрометод определения концентрации иммуноглобулина класса G в цельной крови позволяет измерять его уровень в микрообъёмах периферической крови (1-5 мкл), что очень важно при работе с мелкими экспериментальными животными, а также может быть использовано в клинике.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Хроническая РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→ (C57BL/6х DBA/2)F1 протекает либо по Th1-, либо по Th2-зависимому сценарию, приводя к разным клиническим исходам.

2. Развитие разных вариантов хронической РТПХ определяется Th1/Th2-соотношением донора в начальной фазе реакции.

3. Регулярные физические тренировки являются значимым фактором, участвующим в регуляции функциональной активности клеток иммунной системы у мышей; эффекты тренировок зависят от величины нагрузки и пола животных.

4. Исходная фенотипическая разнородность экспериментальных групп животных, возникающая в результате эпигенетических воздействий таких факторов, как эндокринный статус и двигательная активность, приводит к формированию у генетически идентичных реципиентов разных вариантов хронической РТПХ.



**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на I и II съездах иммунологов России (Новосибирск, 1992; Сочи, 1999); Международной конференции «RNA as Therapeutic and Genomics Target» (Новосибирск, 2001); Объединенном иммунологическом форуме (Екатеринбург, 2004); Всероссийском научном симпозиуме «Цитокины. Стволовая клетка. Иммунитет» (Новосибирск, 2005); на отчётных научных сессиях Института клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск 1993, 1997, 2000, 2003). Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании Проблемной комиссии МНС 56.08 «Иммунология» с участием сотрудников ГУ НИ Института клинической иммунологии СО РАМН 30 июня 2005г.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 37 работ, из них 2 обзора и 13 статей в центральной печати.

**Объём и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, описания материалов и методов исследования, 6-и глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и библиографического указателя. Работа изложена на 267 страницах машинописного текста, иллюстрирована 75 рисунками и 24 таблицами. Список литературы включает 474 источника (47 отечественных и 427 зарубежных).

Работа выполнена в лаборатории регуляции иммунопоэза (руководитель лаборатории д.м.н. В.А.Козлов, академик РАМН, профессор) и лаборатории экспериментальной иммунотерапии (руководитель лаборатории д.м.н. О.П.Колесникова) ГУ НИ Института клинической иммунологии СО РАМН.

Иммуногистохимическое исследование почек и морфологический анализ органов проводили совместно к.м.н. В.А. Логиновым и к.м.н. Л.А. Обуховой (Институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН). Уровень гормонов определяли совместно с к.б.н. И.Н.Оськиной (Институт цитологии и генетики СО РАН) и к.б.н. И.А.Колосовой (Институт систематики и экологии животных СО РАН).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

### **Материалы и методы исследования.**

**Животные.** В работе использовали мышей гибридов первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1 и (CBAxC57Bl/6)F1, самцов и самок, и мышей линий DBA/2, самок, полученных из питомников «Столбовая» (Москва), «Рассвет» (Томск) и экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск). В опытах использовались мыши в возрасте от 2 до 8 месяцев. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской

конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

*Органы, ткани и клетки* выделяли по стандартным методикам [Гольдберг Е.Д. и др., 1992].

*Лимфоциты* выделяли из взвеси клеток селезёнки центрифугированием в градиенте плотности раствора Lympholite M («Cederlane Laboratories Limited»)

*Индукцию хронической РТПХ* у мышей осуществляли путём переноса самкам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2 [Kimura M. et al., 1987]. Каждая мыш-реципиент получала по  $60-70 \cdot 10^6$  клеток путём внутривенной инъекции в хвостовую вену в объёме 0.5 мл среды двукратно с интервалом в 5-6 дней.

*Гуморальный иммунный ответ* на Т-зависимый антиген (эритроциты барана - ЭБ) оценивали на пике ответа, свойственного данному генотипу, по количеству локальных зон гемолиза после внутривенного введения  $2 \cdot 10^8$  ЭБ [Sterzl J et Riha I., 1965; Cunningham A.J. et Szenberg A., 1968].

*Клеточный иммунитет* оценивали по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ): измеряли величину отёка лапы после введения разрешающей дозы ЭБ сенсibilизированным животным по стандартной методике [Yoshikai Y., 1979].

*Число  $Ly1^+B$  клеток* оценивали по количеству клеток в перитонеальном экссудате реципиентов, образующих антитела против компонентов собственных эритроцитов, обработанных бромелаином (Br-MRBC-AOK), спонтанно или после стимуляции LPS [Cunningham A. J., 1974; Mercolino T.J. et al., 1988].

*Культивирование клеток* селезёнки и костного мозга проводили в круглодонных 96-луночных планшетах для культивирования («Linbro») при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$ , в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина,  $4 \cdot 10^{-2}$  мМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ HEPES, 50 мкг/мл гентамицина в объёме 160 мкл/лунку при концентрации клеток  $0.7 \cdot 10^6$ /мл.

*Пролиферативной ответ спленоцитов* на Т- и В-клеточные митогены (Con A, PWM, LPS *E.coli* 055:B5) («Sigma») и аллоантигены тестировали по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, который вносили за 18 часов до конца культивирования в дозе  $37 \cdot 10^3$  Бк/лунку. Оптимальные дозы Con A, PWM и LPS *E.coli*, определённые в предварительных опытах, составили 2 мкг/мл, 1 мкг/мл и 15 мкг/мл, соответственно. В смешанной культуре лимфоцитов в качестве стимуляторов для мышей

BDF1 использовались клетки селезёнки мышей СВА, обработанные митомицином С. Подсчёт радиоактивности проводили в жидкостном сцинтиляционном счётчике SL-30 (Intertechnic, Франция). Результаты выражали в имп/мин и индексах стимуляции (IS, отношение разницы между опытом и контролем к контролю).

**Производство IgG** клетками селезёнки и костного мозга, спонтанную и LPS-стимулированную, определяли в супернатантах клеточных культур после культивирования в течение 7-и дней. Оптимальная доза LPS *E.coli*, определённая в предварительных опытах, составила 30 мкг/мл. Результаты выражали в мкг/мл и индексах стимуляции (IS, отношение разницы между опытом и контролем к контролю).

**Концентрацию IgG** в периферической крови и супернатантах культур, содержание подклассов IgG и антител к ДНК в сыворотке крови определяли твёрдофазным вариантом метода иммуноферментного анализа в 96-луночных плоскодонных планшетах (E.I.A. «Linbro») с помощью меченого пероксидазой хрена конъюгата и ОФД в качестве субстрата [Кэтти Д., Райкундалиа Ч., 1991]. Интенсивность реакции оценивали на многоканальном спектрофотометре «Multiskan» при  $\lambda=492$  nm. Калибровочную кривую строили по препаратам IgG или соответствующих подклассов («Sigma») (10-100 нг/мл). Результаты выражали в абсолютных значениях (мг/мл, мкг/мл) или (при определении антител к ДНК) в абсолютных (OD) и относительных единицах оптической плотности (OD опыта относительно OD контроля -  $OD_o/OD_k$ ).

**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 [Till G.E. et al., 1961; Гольдберг Е.Д. и др., 1992).

**Фазы полового цикла** оценивали по влагалищным мазкам [Киршенблат Я.Д., 1969].

**Содержание кортикостерона** в сыворотке крови мышей определяли методом конкурентного белкового связывания [Тинников А.А. и др., 1984]

**Содержание кортикостерона и половых стероидов** в высушенных экскрементах определяли радиоиммунным методом [Litvinova EA. et al., 2005].

**Морфологический анализ органов** проводили методом обзорной микроскопии и общегистологическими полуколичественными

методами по стандартным методикам [Автандилов Г.Г., 1990]. Степень поражения почек оценивали по шкале 0-4 [Yoshioko H. et al., 1989].

*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 BSA («Sigma») (100-1000 мкг/мл), результаты выражали в мг/мл.

*Статистическая обработка результатов* проводилась методами непараметрической статистики (Гублер Е.В., 1978). На рисунках отмечены достоверные различия ( $p < 0.05$ ): \* - между контрольной и опытной группой; # - между опытными группами.

### Результаты исследования и их обсуждение.

#### *Гетерогенность реципиентов, выявляемая при развитии хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2 → (C57Bl/6xDBA/2)F1.*

К одной из самых популярных в последние годы моделей хРТПХ относится перенос гибридам (C57Bl/6xDBA/2)F1 лимфоидных клеток мышей родительской линии DBA/2, что приводит к развитию аутоиммунной патологии, которая аналогична СКВ человека по клиническим и патоморфологическим признакам: персистенция лимфоидной гиперплазии, продукция аутоантител, формирование иммунокомплексного гломерулонефрита [Via C. S. et al. 1988].

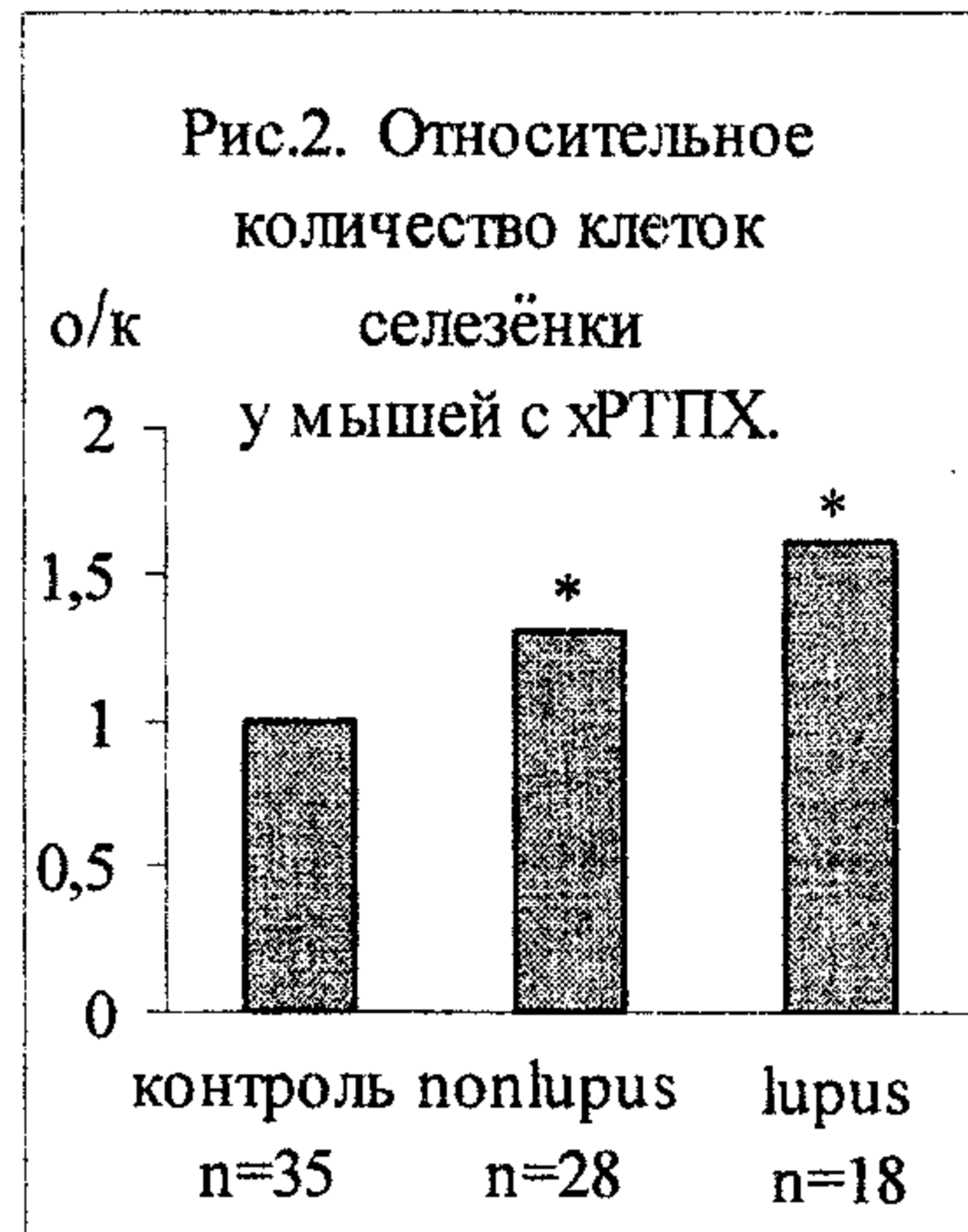
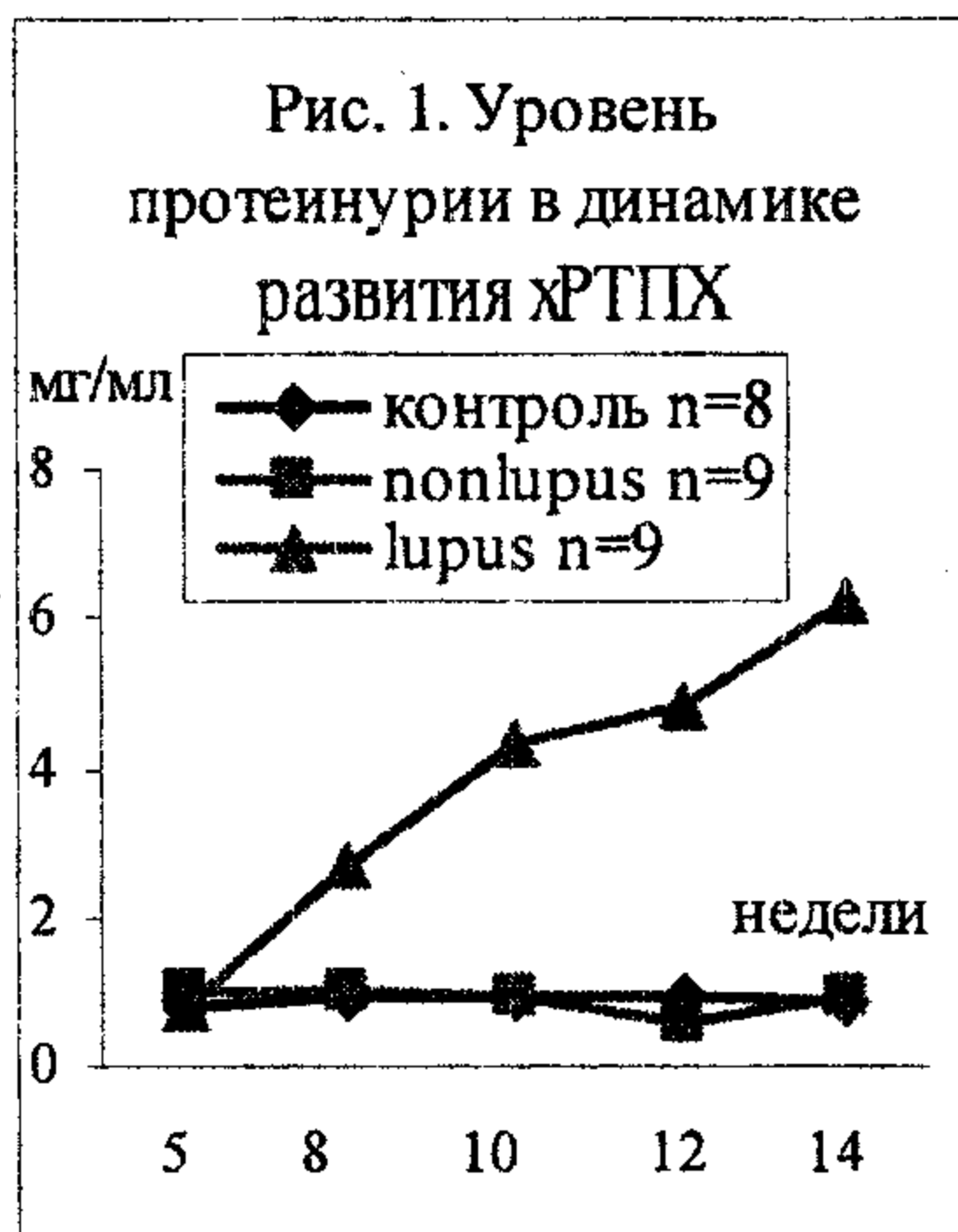
Индуцируя хРТПХ по описанной методике, мы столкнулись с тем, что в наших опытах развитие аутоиммунной патологии – lupus-подобного иммунокомплексного гломерулонефрита - наблюдалось всегда только у части животных. Опираясь на явное различие реципиентов, мы разделили их на две группы (в дальнейшем обозначаемые как lupus и nonlupus, соответственно, с проявлениями нефрита или без него). Для выбора достоверного критерия формирования гломерулонефрита нами была исследована сопряжённость морфологических признаков поражения почек и концентрации белка в моче. На основании данных литературы и собственных результатов основным диагностическим критерием развития гломерулонефрита в нашей модели следует считать стойкое наличие белка в моче более 3 мг/мл (рис.1) [Kimura M. et al., 1987; Yoshioko H. et al., 1989].

Для характеристики обнаруженной гетерогенности среди реципиентов в дальнейшем оценивали частоту развития lupus-нефрита

по уровню протеинурии и проводили сравнительное изучение параметров иммунной системы у групп nonlupus и lupus опытных мышей.

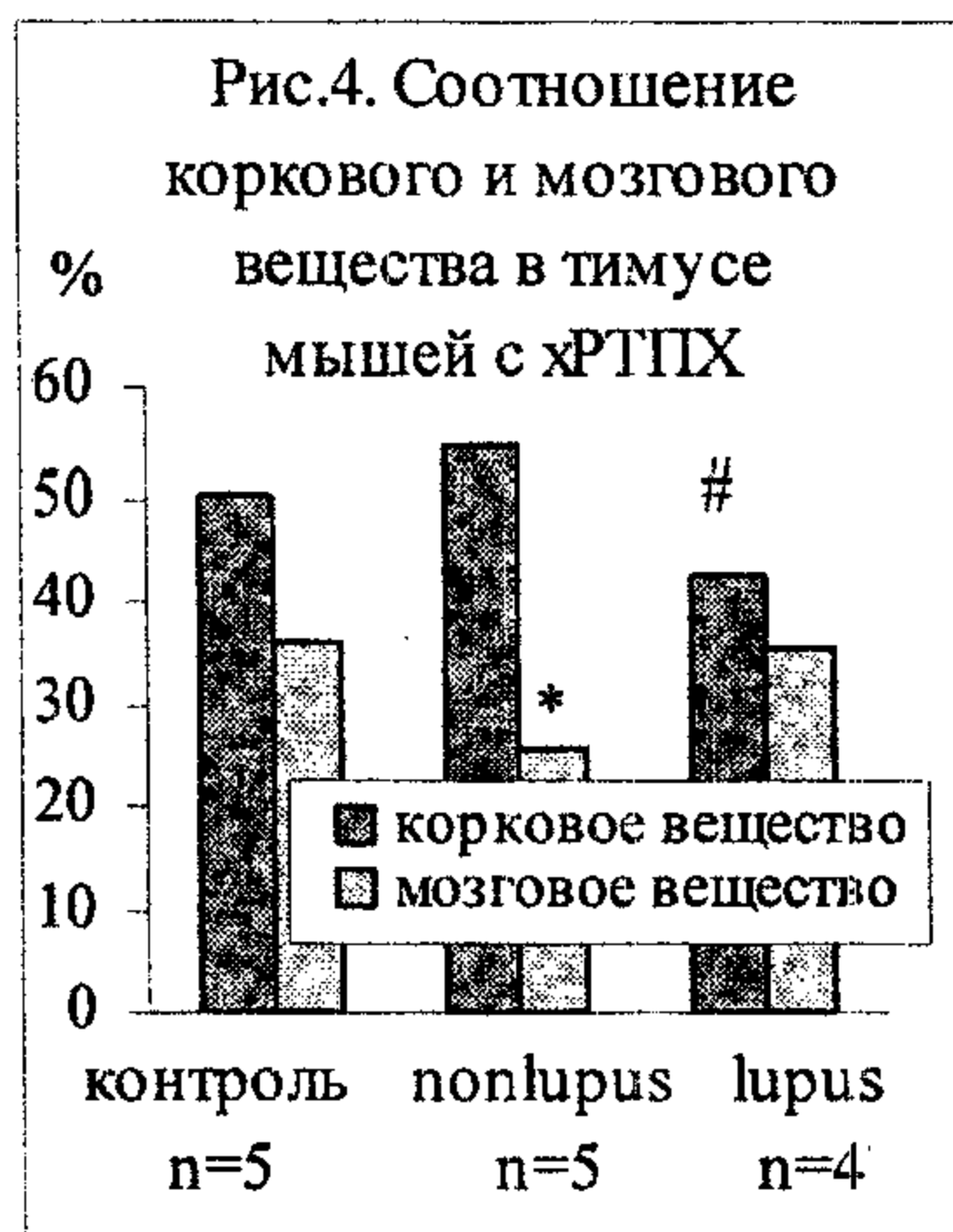
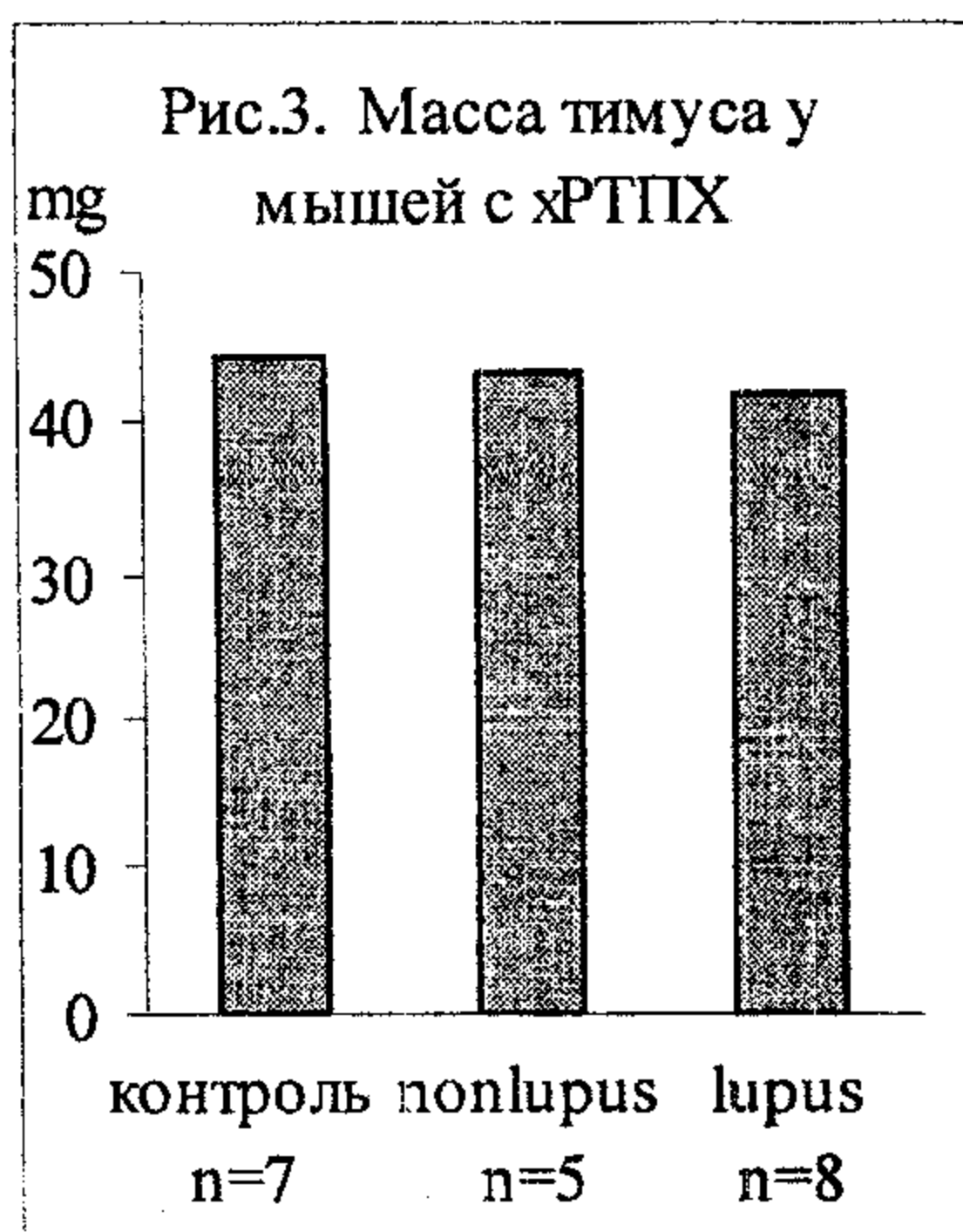
### **Наличие признаков хронической РТПХ.**

При развитии РТПХ в организме реципиента наблюдаются выраженные изменения тканей и органов, в первую очередь, иммунной системы. Хроническая РТПХ характеризуется специфическим набором признаков, однозначно отличающих её от Th1-зависимой острой формы. Характерной особенностью хронической РТПХ является увеличение количества клеток селезёнки не только на ранних стадиях, но и выраженная спленомегалия на всех сроках наблюдения, что обуславливается лимфопролиферативными процессами, не ограничиваемыми цитотоксическим действием трансплантированных клеток [Via C.S., Shearer G.M., 1988]. Изучение этого параметра у реципиентов показало, что РТПХ развивается по хроническому типу в обеих группах (рис.2, представлены данные опытных групп относительно значений контроля).



Острая РТПХ характеризуется деструктивными изменениями ткани тимуса, которые развиваются уже на ранних сроках, в дальнейшем переходя в практически полную атрофию органа; при хронической форме РТПХ изменения тимуса незначительны [Krenger W. et al., 2000]. Изучение тимуса в нашей модели показало, что у реципиентов обеих исследуемых групп масса и число клеток не отличаются достоверно от интактного контроля соответствующего пола и возраста (рис.3).

Морфометрическим исследованием тимуса установлено, что у животных обеих групп изменения органа незначительны. Структура коры и мозгового вещества сохранена, плотность расположения лимфоидных клеток не отличается от контроля. Не обнаружено типичного для острой формы РТПХ снижения относительного объема коркового вещества у реципиентов обеих групп по сравнению с контролем, однако при сравнении реципиентов разных групп между собой оказалось, что у мышей lupus этот параметр достоверно ниже, чем у мышей nonlupus (рис.4). В тимусе мышей lupus достоверно увеличен относительный объем внутридольковых периваскулярных пространств (ВПП), клеточный состав их представлен преимущественно плазматическими клетками разной степени зрелости. Отмеченные изменения ткани тимуса не являются типичными для острой формы; состояние органа у обеих групп согласуется с описанным при хронической РТПХ.



Характерный признак хронической РТПХ - поликлональная активация В-клеток, следствием которой является высокий уровень IgG в сыворотке крови и продукция аутоантител разной специфичности, при этом аутоантитела при РТПХ представлены иммуноглобулинами класса IgG, в отличие от аутоантител, определяемых в низком титре у интактных животных и относящихся преимущественно к классу IgM [Morris S.C., 1990]. Считается, что именно активная продукция таких аутоантител приводит к развитию аутоиммунных патологий в данной и других аналогичных моделях. Показано, что аутоантитела к dsДНК и ssДНК играют патогенетическую роль при формировании иммунокомплексного

гломерулонефрита и служат диагностическим признаком развития системной красной волчанки, хотя прямая корреляция между уровнем аутоантител различной специфичности, в том числе и к ДНК, и развитием аутоиммунной патологии отсутствует [Meziere C. et al., 1994; Saoudi A. et al., 1995; Waldman M., Madaio M. P., 2005]. Так как в наших экспериментах развитие гломерулонефрита наблюдалось только в одной группе, особый интерес представляло изучение уровня IgG и определение аутоантител к ДНК в периферической крови реципиентов в динамике развития хронической РТПХ.

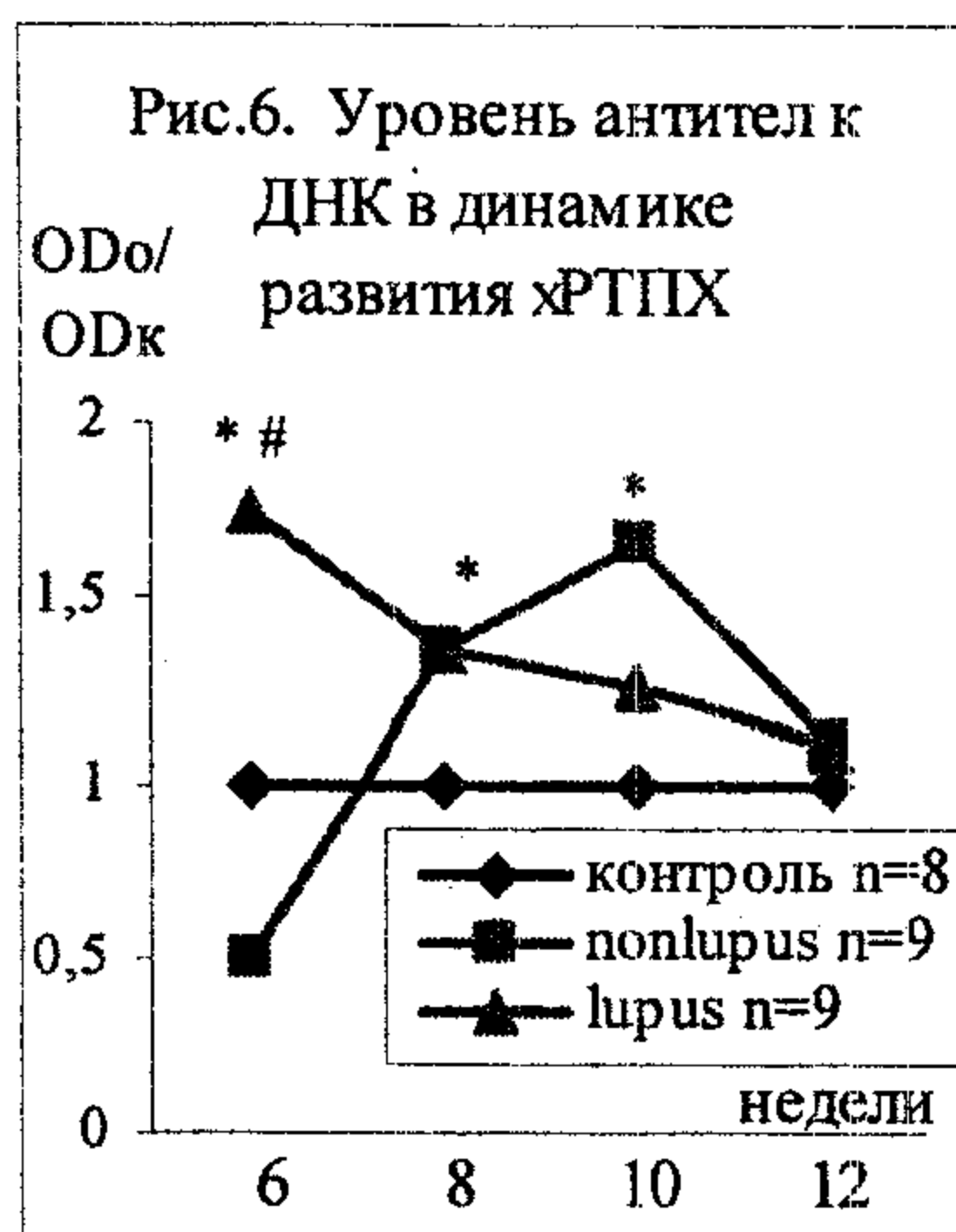
Для прижизненного мониторинга уровня иммуноглобулинов в периферической крови реципиентов в динамике развития РТПХ нами был разработан микрометод определения концентрации иммуноглобулинов в цельной крови, так как многократный забор периферической крови у животных такого небольшого размера, как лабораторные мыши кроме сильного стресса может приводить и к значительной кровопотере, а, следовательно, и к изменению активности кроветворного ростка и состояния иммунной системы, что не может не сказаться на результатах [Козлов В.А. и др., 1982].

Многократное измерение концентрации IgG в периферической крови выявило, что увеличение уровня иммуноглобулина определяется на самых ранних сроках после индукции реакции у *nonlupus* и *lupus* реципиентов и затем с некоторыми колебаниями продолжает держаться на более высоком, чем в контроле уровне на всех сроках наблюдения (рис. 5; представлены данные опытных групп относительно значений контроля).

Определение антител к ДНК также показало, что в обеих группах опытных мышей титры антител достоверно превышают контрольные значения, хотя реципиенты, впоследствии попадающие в группу *nonlupus* или *lupus*, что становится окончательно ясным через 3 месяца после индукции реакции, демонстрируют разную динамику этого показателя. В группе *lupus* мышей высокие титры антител к ДНК определяются на ранних стадиях и ко второму месяцу уже снижаются, возможно, вследствие связывания с антигеном и последующей фиксации образующихся иммунных комплексов в почках, что, по-видимому, и приводит к их поражению и развитию в дальнейшем гломерулонефрита. В группе мышей *nonlupus* к этому сроку только начинается нарастание титров, которые не достигают уровня, определяемого у мышей *lupus* на пике ответа (рис.6).

Таким образом, в наших опытах перенос мышам B6D2F1 лимфоидных клеток мышей родительской линии DBA/2 приводит к развитию у всех реципиентов хронической РТПХ, о чём

свидетельствует наличие характерных для неё признаков: спленомегалии, гипергаммаглобулинемии, продукции аутоантител к ДНК при отсутствии выраженной атрофии тимуса, однако особенности реакции отличаются у изучаемых групп, что свидетельствует о различиях в развитии РТПХ у реципиентов nonlupus и lupus. Таким образом, несмотря на генетическую, половую, возрастную идентичность реципиентов, одинаковые условия содержания и стандартные условия одномоментного переноса одних и тех же донорских клеток перенос полуаллогенных лимфоидных клеток в системе DBA/2 → (DBA/2 × C57Bl/6)F1 приводит к возникновению двух вариантов хронической РТПХ, изучение которых и было дальнейшей задачей.



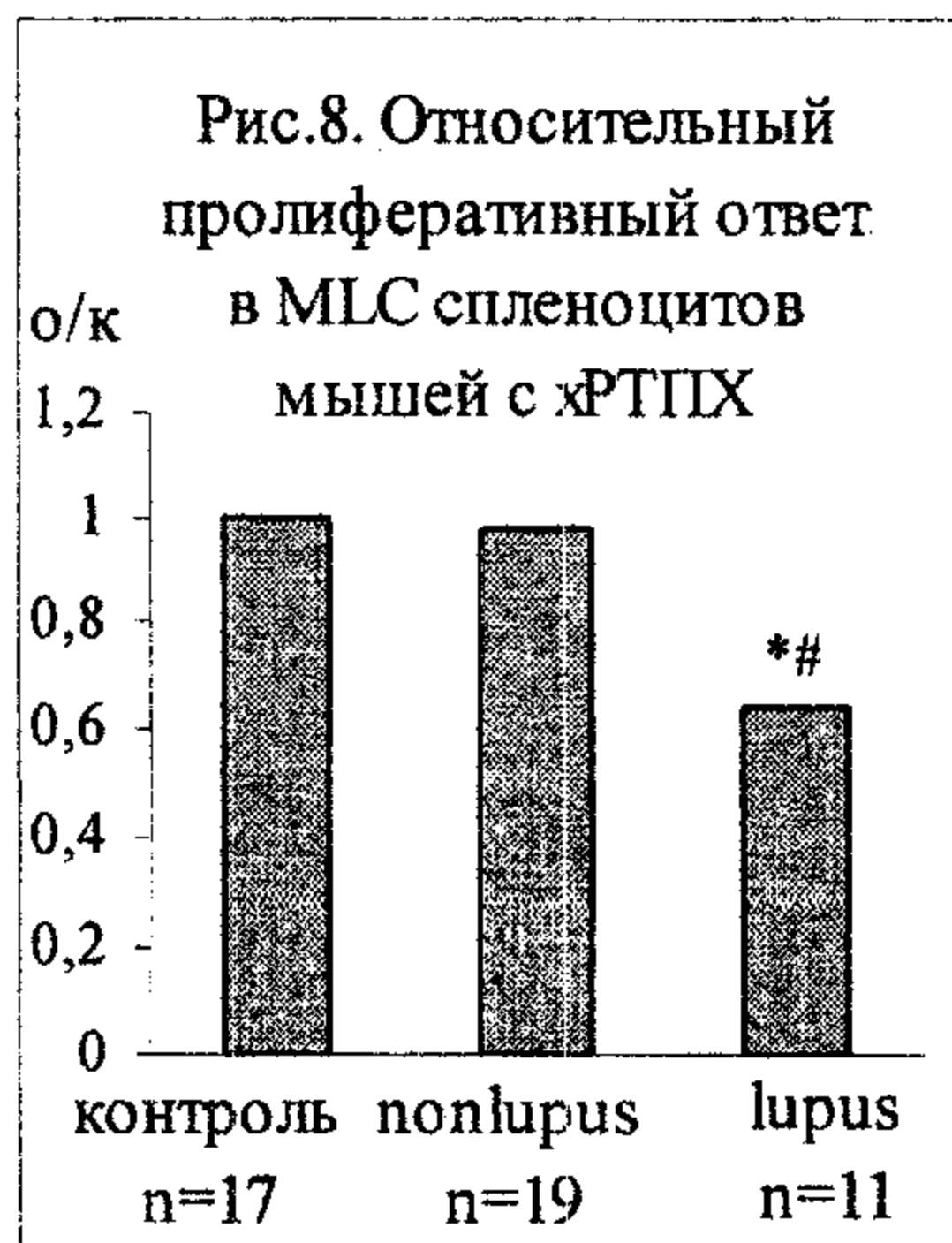
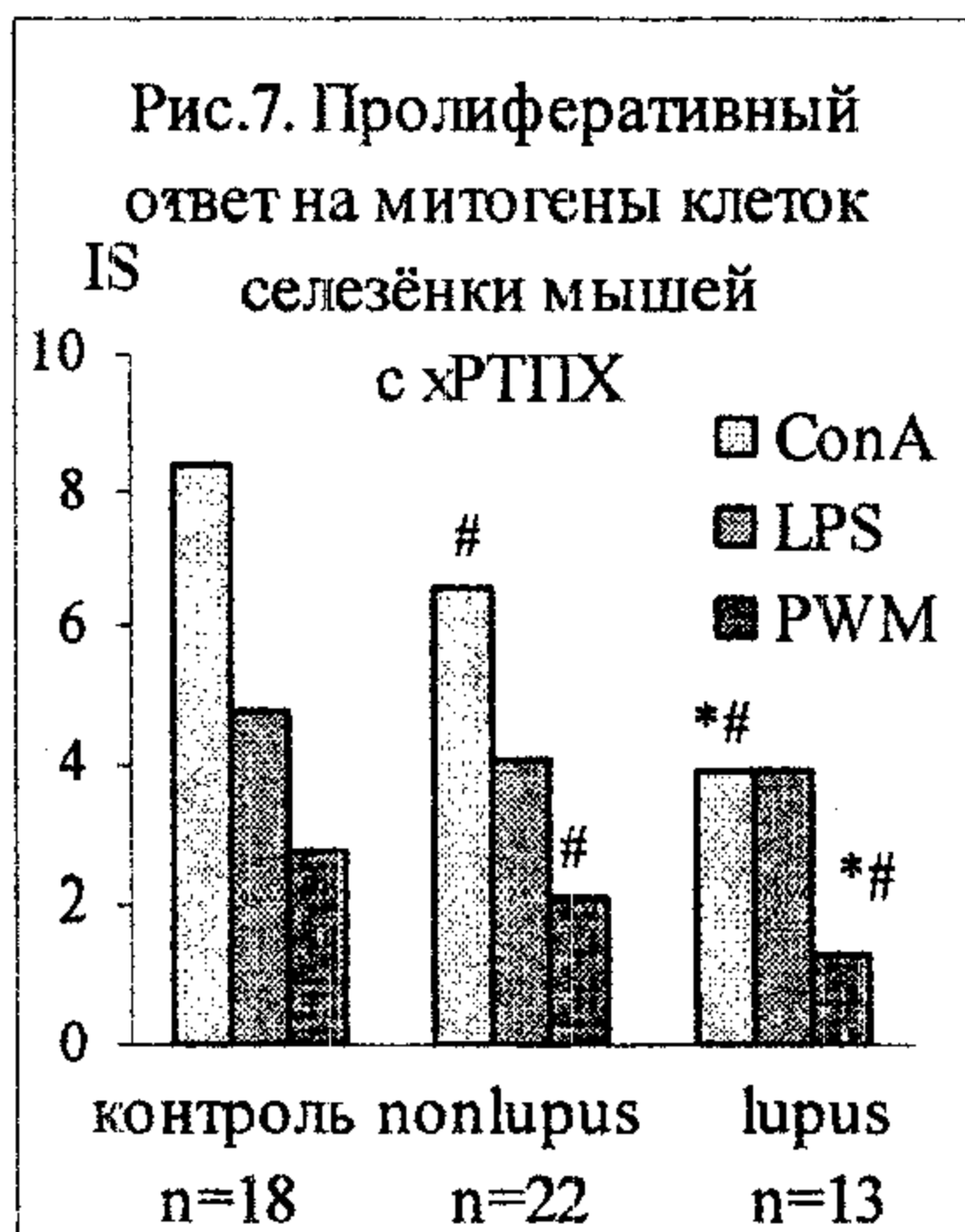
#### Характеристика функциональной активности лимфоцитов в культуре *in vitro*.

Для характеристики состояния иммунной системы у животных опытных групп оценивали функциональную активность клеток в системе *in vitro*.

Изучение пролиферативного ответа клеток селезёнки на Т- и В-клеточные митогены выявило достоверное снижение ConA- и PWM-стимулированной пролиферации спленоцитов мышей lupus по сравнению с группой nonlupus и интактными мышами; ответ на LPS достоверно не отличался ни между опытными группами, ни по сравнению с контролем (рис. 7). Реакция в смешанной культуре лимфоцитов (MLC) рассматривается как аналог клеточного ответа *in vivo*. В группе животных nonlupus пролиферативный ответ спленоцитов в MLC не отличается от контроля, а в группе животных



lupus отмечается достоверное снижение ответа как по сравнению с мышами nonlupus, так и с контрольными животными (рис.8, представлены данные опытных групп относительно контрольных значений). Поскольку известно, что LPS непосредственно стимулирует В-лимфоциты, в то время как действие PWM на В-клетки опосредуется Т-лимфоцитами [Рингден О., Мюллер Э., 1980], можно говорить о снижении функциональной активности Т-клеток (ответ на ConA, PWM и в MLC) у lupus-реципиентов.



Так как у реципиентов определяется повышенный уровень IgG в периферической крови, для выяснения источника продуцируемых иммуноглобулинов мы оценивали синтез IgG в культуре спленоцитов и клеток костного мозга. Значительных различий в уровне синтеза IgG клетками селезёнки мышей с протеинурией и без протеинурии не выявлено; клетки костного мозга опытных мышей продуцируют более высокие уровни IgG по сравнению с интактными мышами. Таким образом, по-видимому, в основном за подъём сывороточного уровня IgG ответственны В-клетки костного мозга.

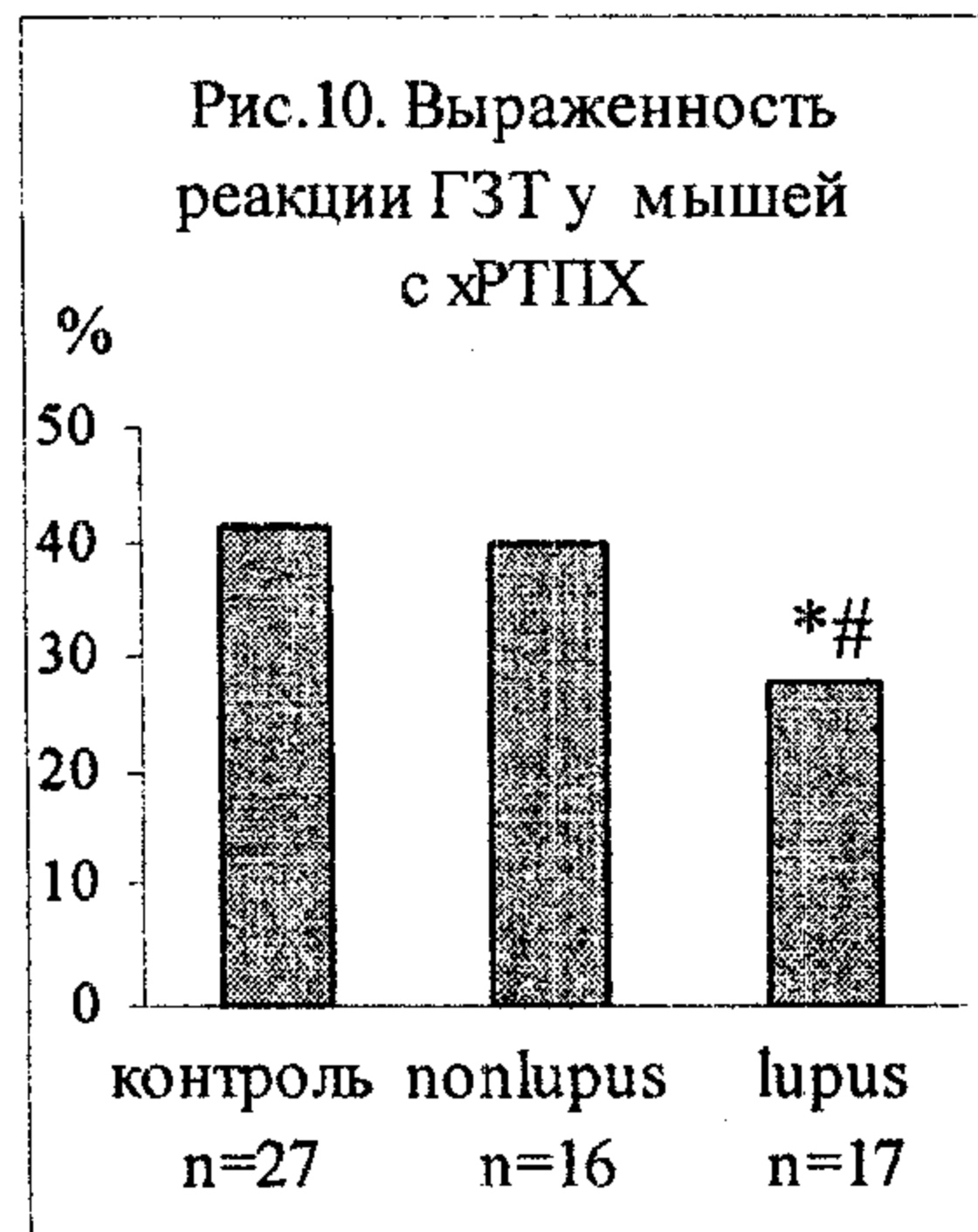
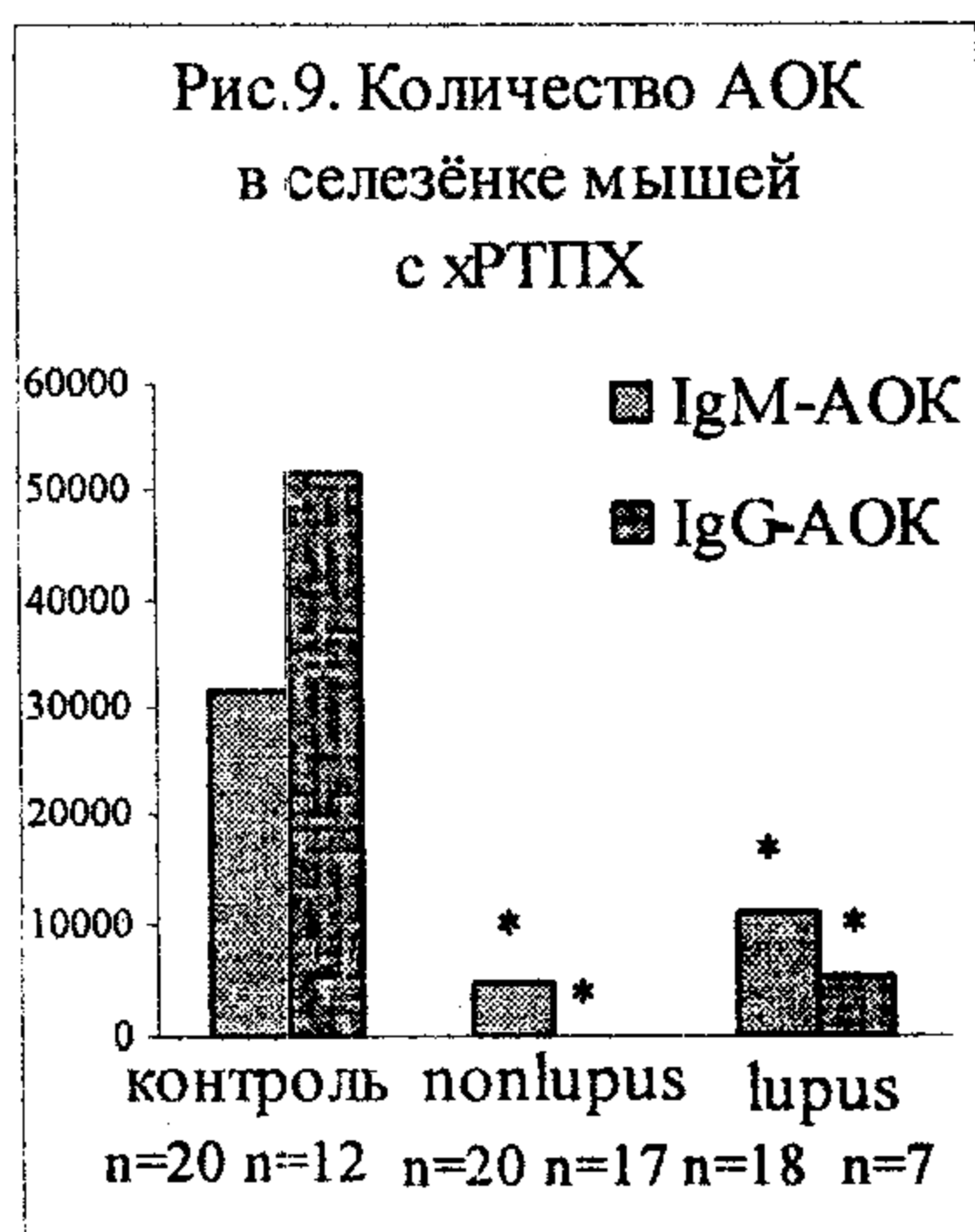
#### *Характеристика иммунных параметров в опытах in vivo.*

В качестве интегральной оценки состояния иммунной системы на уровне организма была изучена способность реципиентов отвечать на Т-зависимый антиген in vivo.

Определение количества специфических IgM- и IgG-АОК в селезёнке реципиентов после иммунизации Т-зависимым антигеном (ЭБ) выявило резкое подавление гуморального иммунного ответа (рис.9); супрессия касается как IgM-, так и IgG-ответа, при этом ингибция у мышей nonlupus-группы выражена сильнее: они

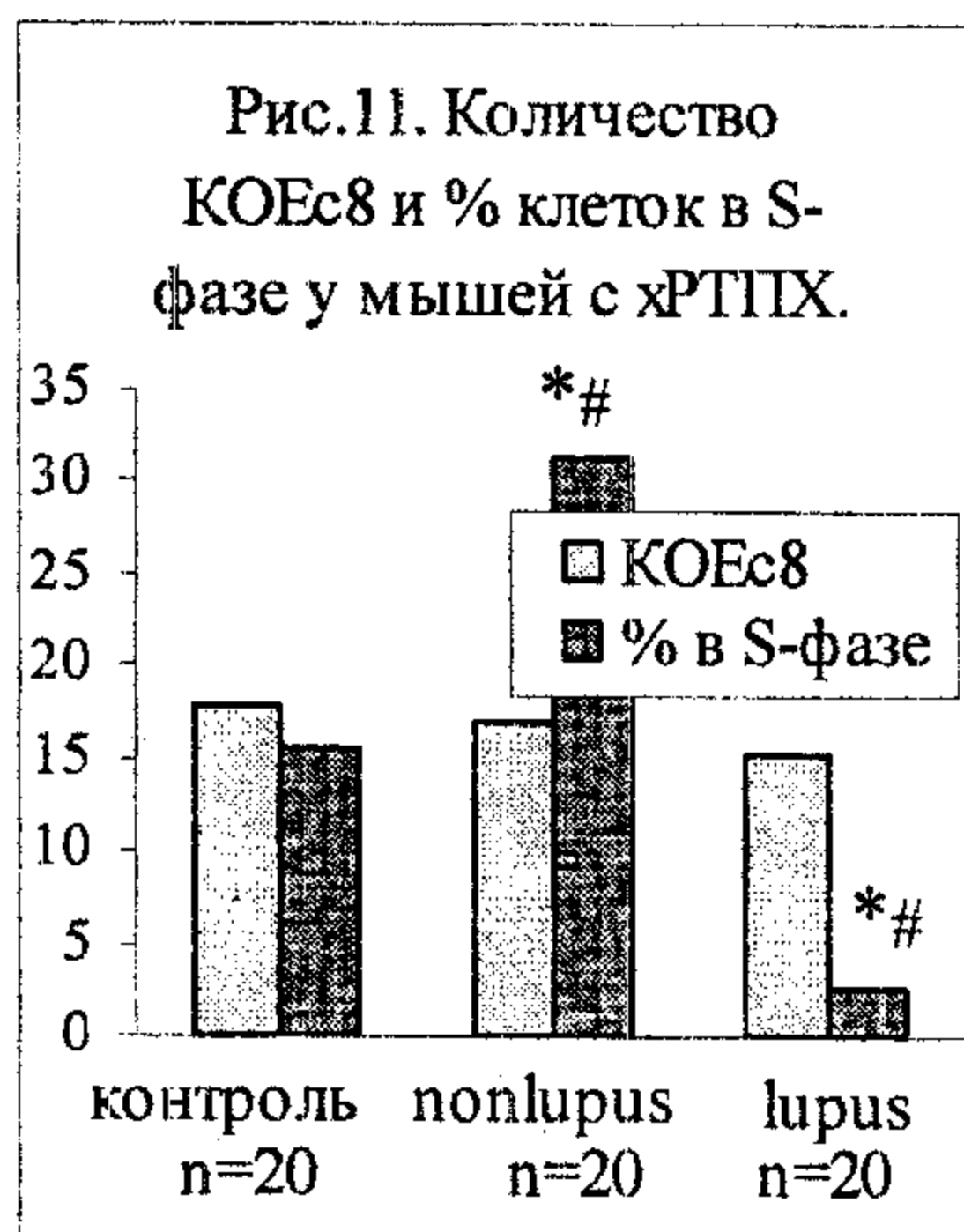
практически перестают отвечать на Т-зависимый антиген образованием IgG-антителопродуцентов.

В качестве оценки клеточного звена иммунитета определяли выраженность ГЗТ на тот же антиген (ЭБ). Оказалось, что у lupus-животных отмечается достоверное подавление ГЗТ, в то время как у nonlupus-реципиентов ответ не отличался от контроля (рис. 10), что согласуется с полученными в опытах *in vitro* результатами, говорящими о снижении функциональной активности Т-клеток только в группе lupus-мышей.



Таким образом, развитие хронической РТПХ сопровождается подавлением первичного иммунного ответа на Т-зависимый антиген, при этом в группе lupus наблюдается снижение как клеточных, так и гуморальных реакций, тогда как у животных другой группы (без протеинурии) более выражено подавление продукции антител при сохранённом уровне клеточного ответа.

Результаты, полученные при изучении других параметров, также подтверждают различный характер изменений у nonlupus- и lupus-реципиентов. Исследование гемопоэза обнаружило, что пролиферативная активность кроветворных клеток-предшественников повышена у nonlupus- и угнетена у lupus-мышей (рис.11). Оценивание функциональной активности нейтрофилов периферической крови по способности восстанавливать NBT спонтанно и при стимуляции продигозаном показало ее снижение в группе lupus по сравнению с контролем и nonlupus-группой (рис.12).



По литературным данным, в патогенезе некоторых аутоиммунных заболеваний существенное значение имеет немногочисленная популяция В-клеток, в отличие от основной массы В-лимфоцитов несущая на своей поверхности маркер CD5 (Ly1<sup>+</sup>) [Shoenfeld Y., Isenberg D.A., 1989; Hardy K.K., Hayakawa K., 1996]. Фоновое содержание таких клеток у B6D2F1 невелико и достоверно не отличается у опытных и контрольных животных. При стимуляции LPS прирост количества Ly1<sup>+</sup>В-клеток у мышей с РТПХ достоверно снижен по сравнению с контролем; при этом различия отмечаются и между опытными группами (рис.13). Эти данные свидетельствуют о том, что механизм развития аутоиммунного lupus-подобного нефрита при индукции хронической РТПХ не связан с активацией Ly1<sup>+</sup>В-клеток.

Таким образом, изучение функциональной активности клеток иммунной системы в опытах *in vitro* и *in vivo* обнаружило различный характер изменений в иммунной системе у nonlupus- и lupus-реципиентов, при этом развитие аутоиммунного варианта хРТПХ сопровождается супрессией Т-клеток, тогда как функциональная активность Т-клеток реципиентов, относящихся к группе nonlupus, не отличается от контроля.

#### **Определение подклассов иммуноглобулинов IgG1/IgG2a в сыворотке крови мышей-реципиентов.**

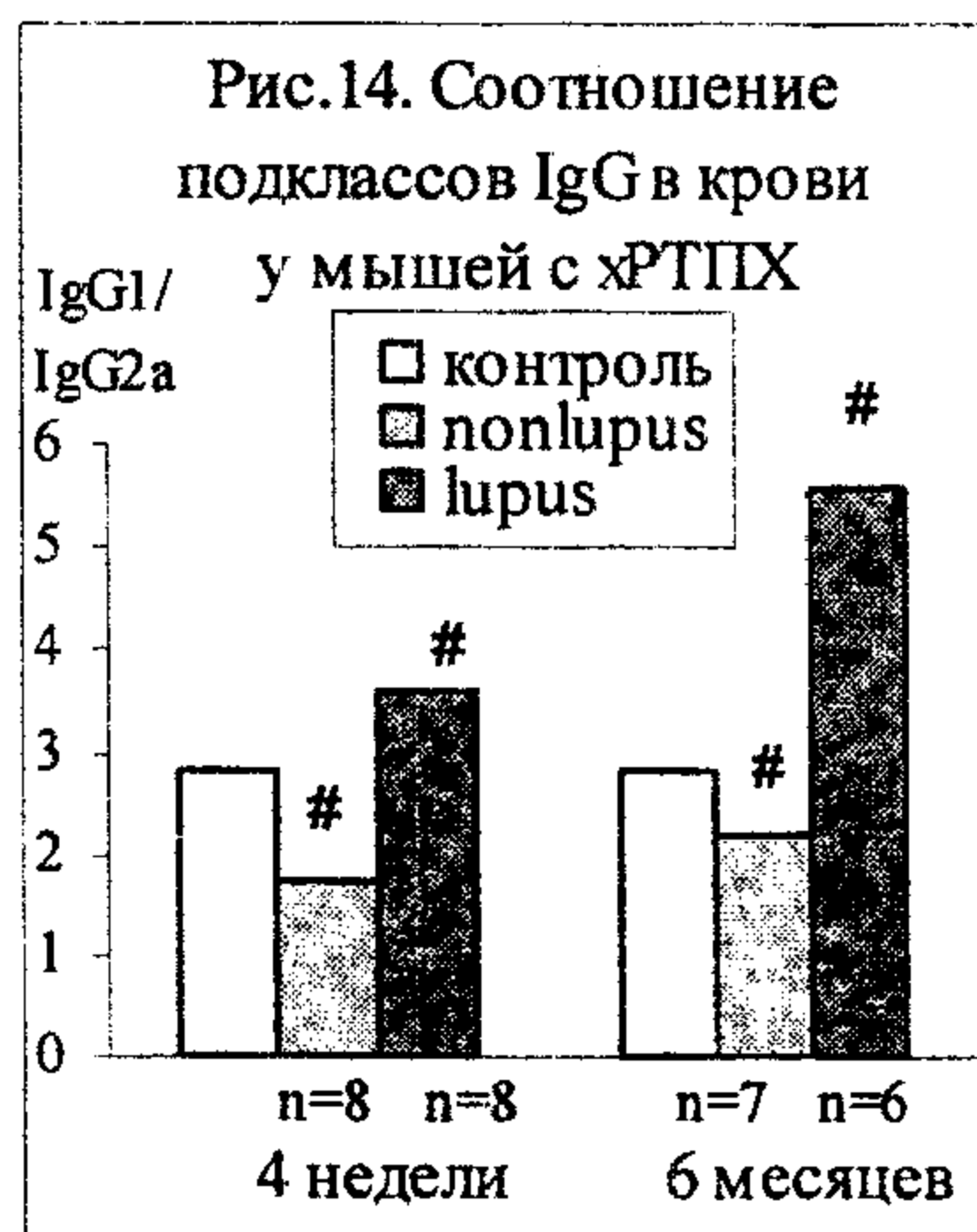
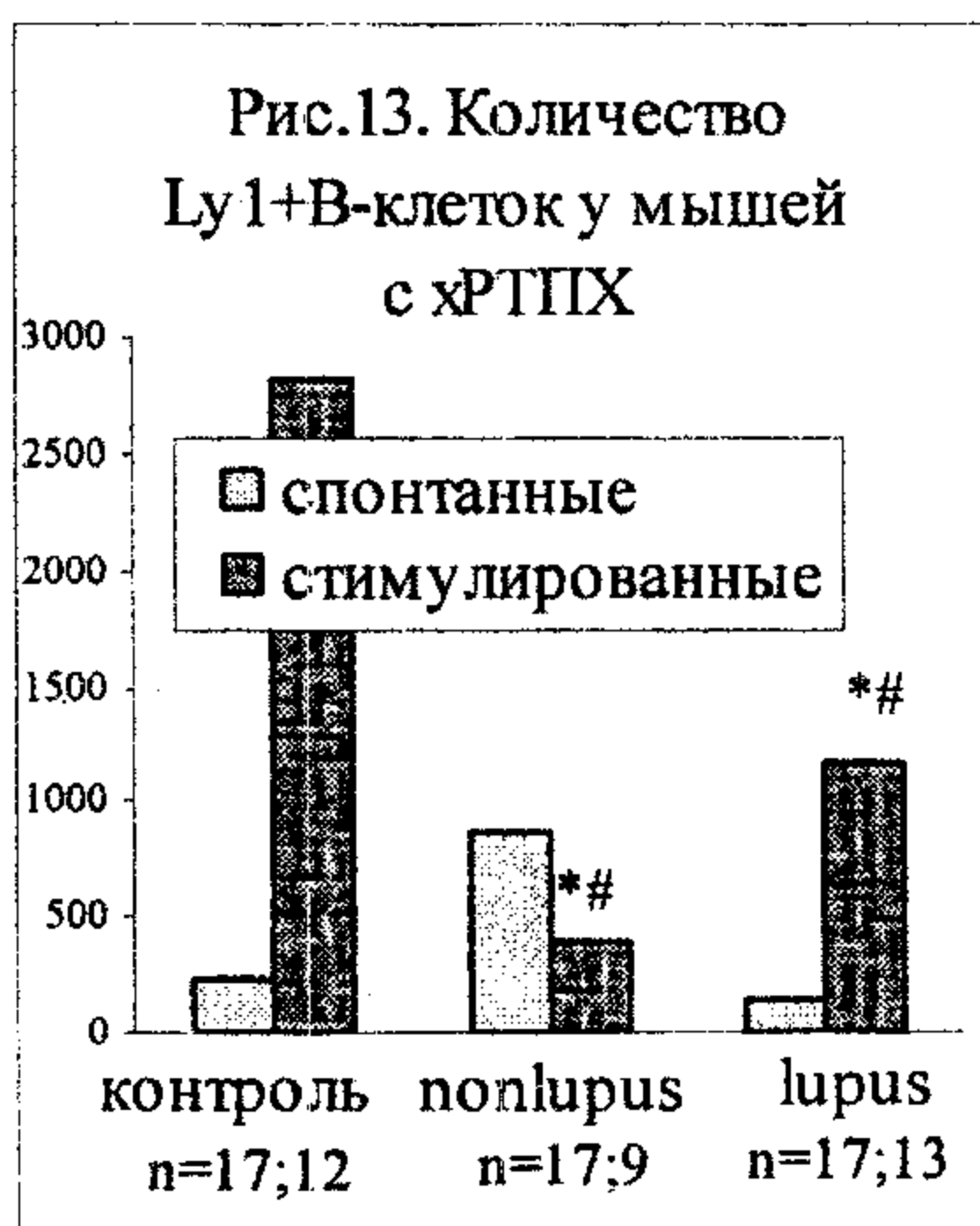
На основании полученных данных о состоянии Т- и В-клеточного звеньев иммунитета у реципиентов nonlupus и lupus можно предположить, что течение хронической РТПХ может быть

направлено по двум разным путям в зависимости от преобладающей активности Th1 или Th2.

Учитывая, что содержание в сыворотке цитокинов, продуцируемых этими клетками, подвержено большим колебаниям и может не отражать активацию той или другой субпопуляции при однократном измерении, для проверки данного предположения было изучено соотношение подклассов IgG в сыворотке реципиентов как интегральный показатель доминирования Th1- или Th2-лимфоцитов. Th1-зависимый иммунный ответ характеризуется увеличением IgG2a, тогда как продукция Th2-цитокинов сопровождается повышением IgG1 [Shapper C. M. et al., 1987].

В предварительных опытах нами было показано, что у самок гибридов BDF1, используемых в опытах по индукции хРТПХ, определяются все подклассы IgG и в достаточно больших количествах представлены подклассы IgG1 и IgG2a, что делает возможным использование их определения для характеристики относительной активации Th1- или Th2-клеток.

Определение соотношения подклассов иммуноглобулинов IgG1/IgG2a выявило различия между двумя опытными группами, которые нарастали с течением времени: у nonlupus-реципиентов определяется более выраженная продукция иммуноглобулинов подкласса IgG2a, тогда как у мышей lupus – IgG1, что свидетельствует о преимущественной активации, соответственно, Th1- и Th2-клеток (рис. 14).



Таким образом, характер изменения соотношения подклассов IgG, а также данные о подавлении Т-клеточных реакций как *in vivo*, так и *in*

in vitro у мышей с протеинурией в отличие от мышей nonlupus позволяют сделать вывод о сдвиге баланса Th-клеток при индукции хронической РТПХ в сторону Th1 в случае мышей nonlupus и в сторону Th2 в случае мышей lupus.

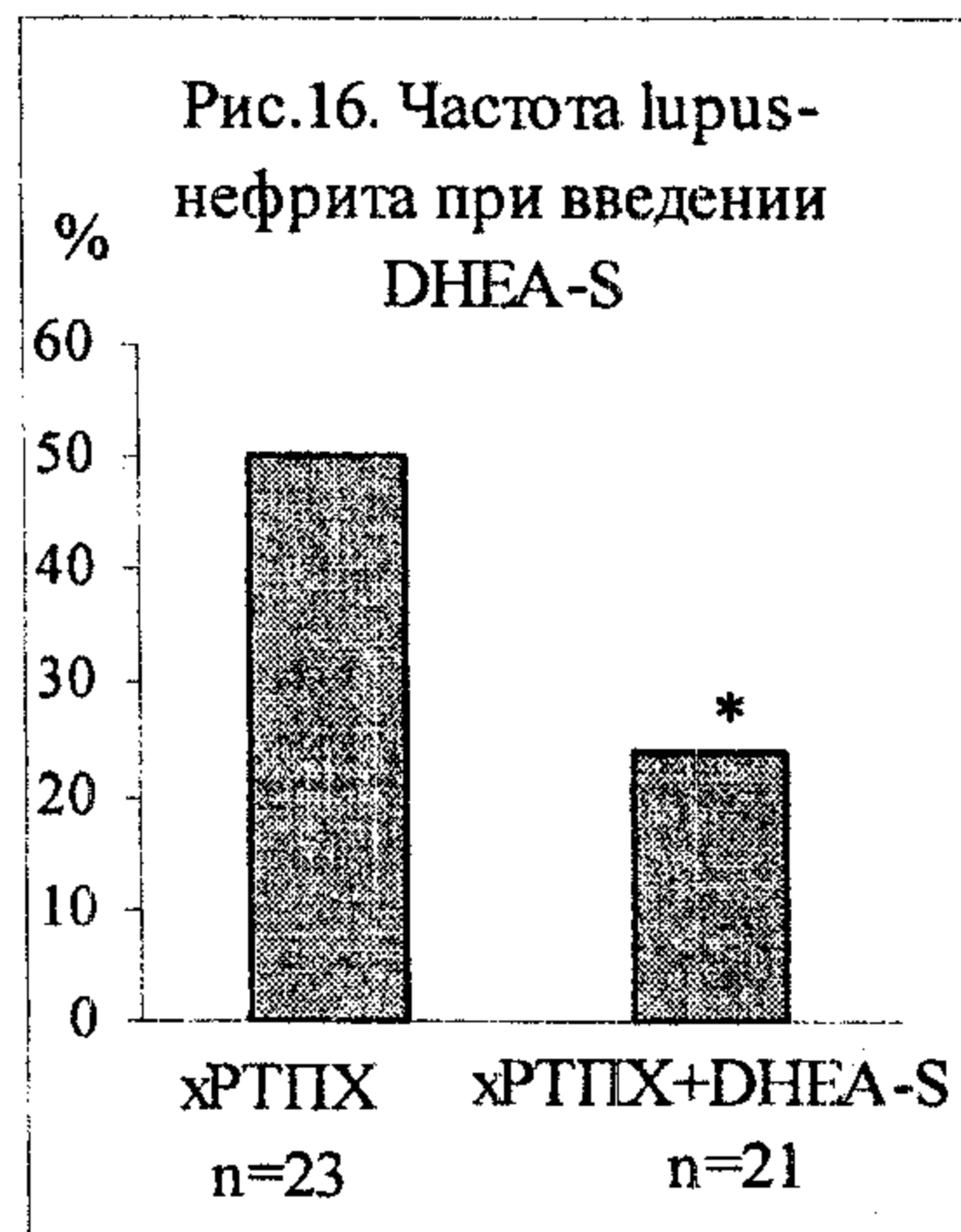
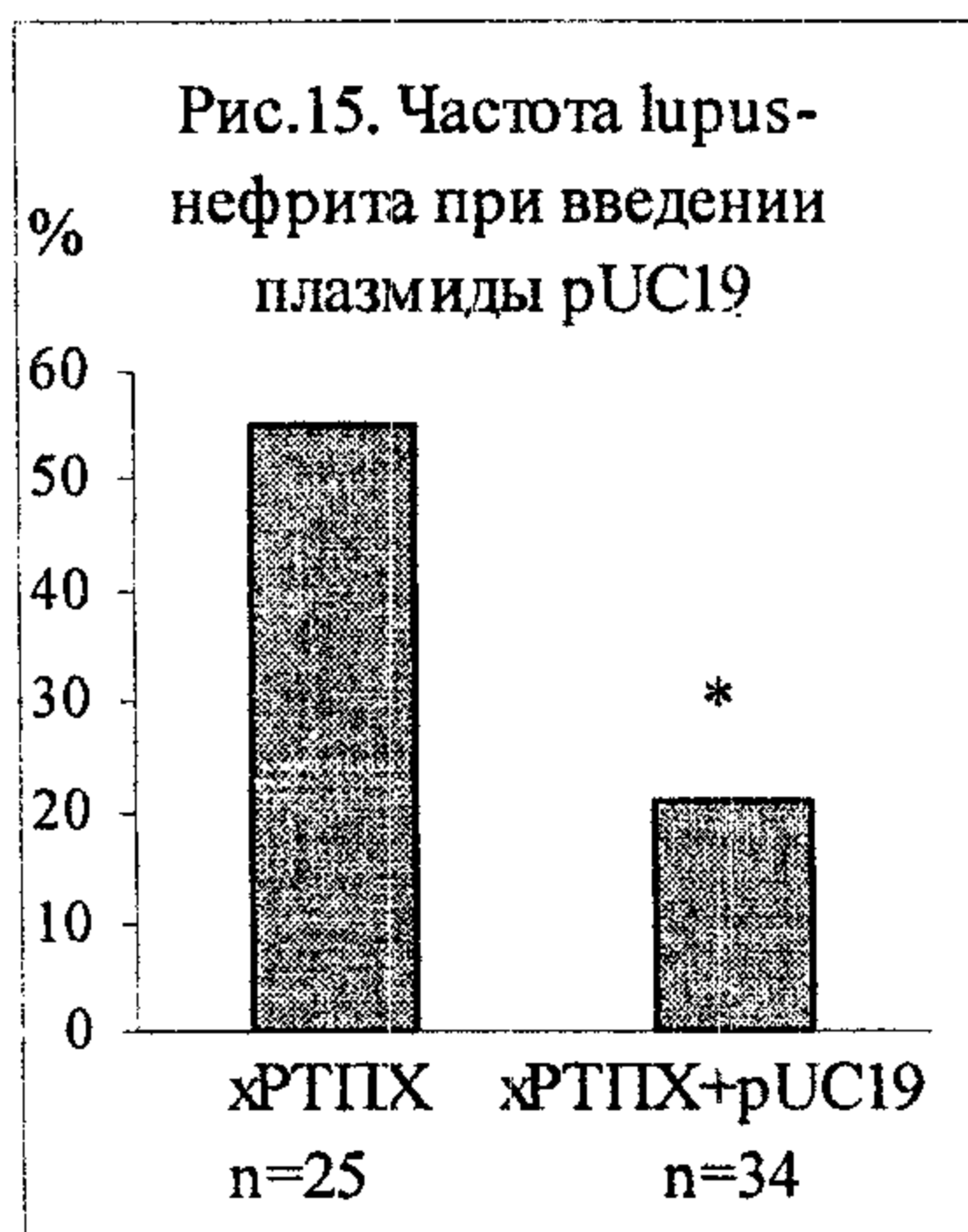
Как известно, острая РТПХ возникает при различиях клеток донора и реципиента по антигенам ГКГС I и II класса, тогда как в случае различий только по антигенам ГКГС II класса формируется хроническая РТПХ. Хотя обе формы реакции начинаются активацией Th2-клеток, при развитии острой формы в дальнейшем происходит переключение на Th1-ответ, что стимулирует цитотоксические процессы. При хронической форме в силу разных причин остаются активными Th2-клетки и наступления цитотоксической стадии не происходит. В полуаллогенной системе C57Bl/6→(C57Bl/6xDBA/2)F1 индуцируется острая РТПХ, при переносе DBA/2→(C57Bl/6xDBA/2)F1, несмотря на различия донора и реципиента по антигенам ГКГС I и II класса, развивается хроническая форма реакции [Gleichmann E. et al., 1982; Gleichmann E. et al., 1984]. Неспособность клеток DBA/2 мышей индуцировать острую РТПХ может быть объяснена различной способностью мышей с гаплотипами H2<sup>b</sup> или H2<sup>d</sup> продуцировать воспалительные цитокины, такие, как IFN-γ, TNF-α, IL-6 [De Maeyer-Guignard J. et al., 1986; Raj N.B., 1992]. Кроме того, показано, что популяция CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов у DBA/2 мышей качественно и количественно дефектна. CD8<sup>+</sup> Т-клетки DBA/2 мышей генерируют слабый аллогенный ответ in vitro и частота прекурсоров ЦТЛ у DBA/2 мышей в 9 раз меньше по сравнению с мышами C57Bl/6 [Via C.S. et al., 1987]. В связи с этим в данной системе активация Th1-клеток может вести не к переключению на цитотоксическую фазу реакции, а к развитию ранее неизвестной Th1-зависимой формы хронической РТПХ, формирующей иммунопатологическое состояние с гуморальным иммунодефицитом, а не иммунокомплексным гломерулонефритом на первом плане.

#### *Модуляция развития иммунопатологических состояний*

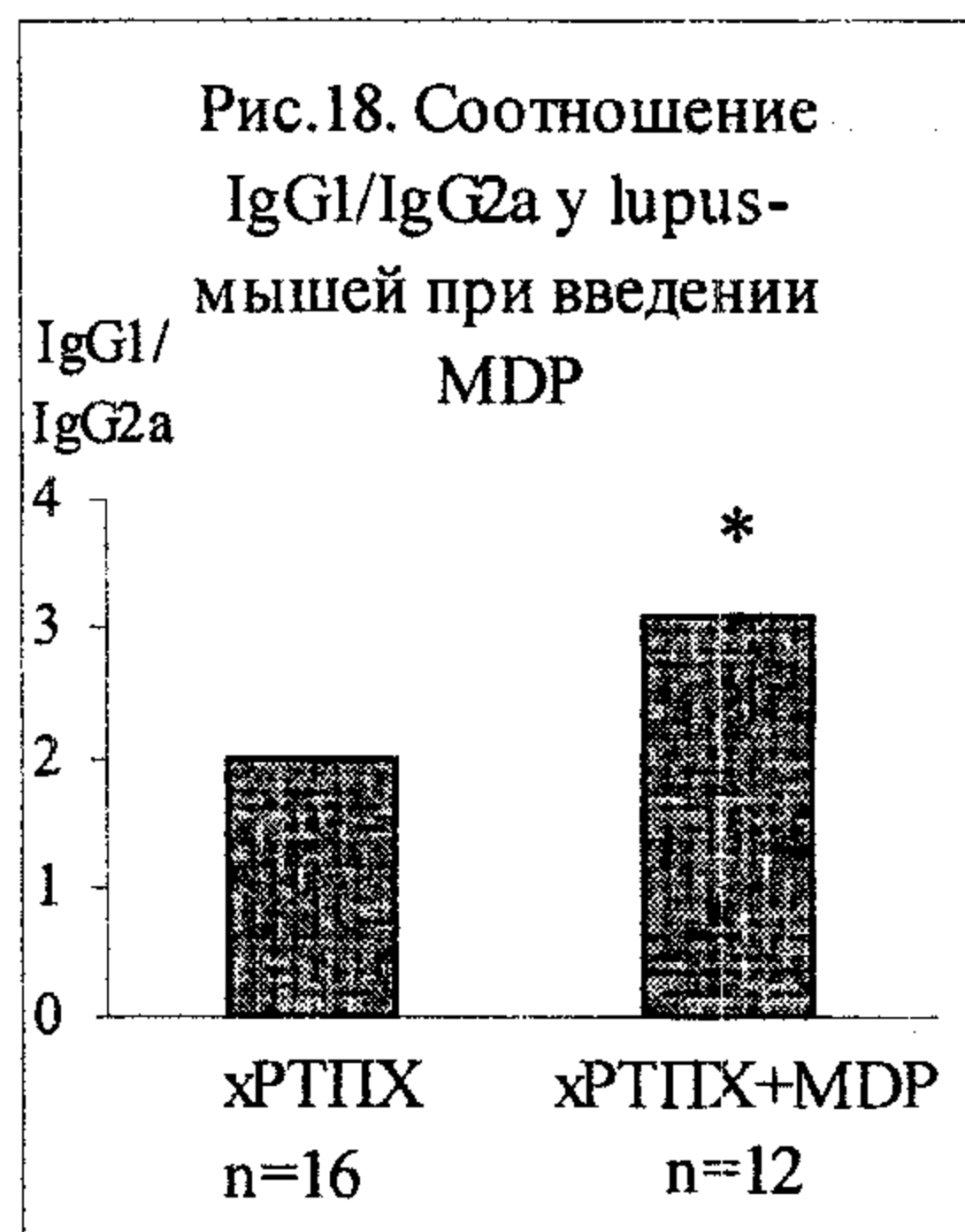
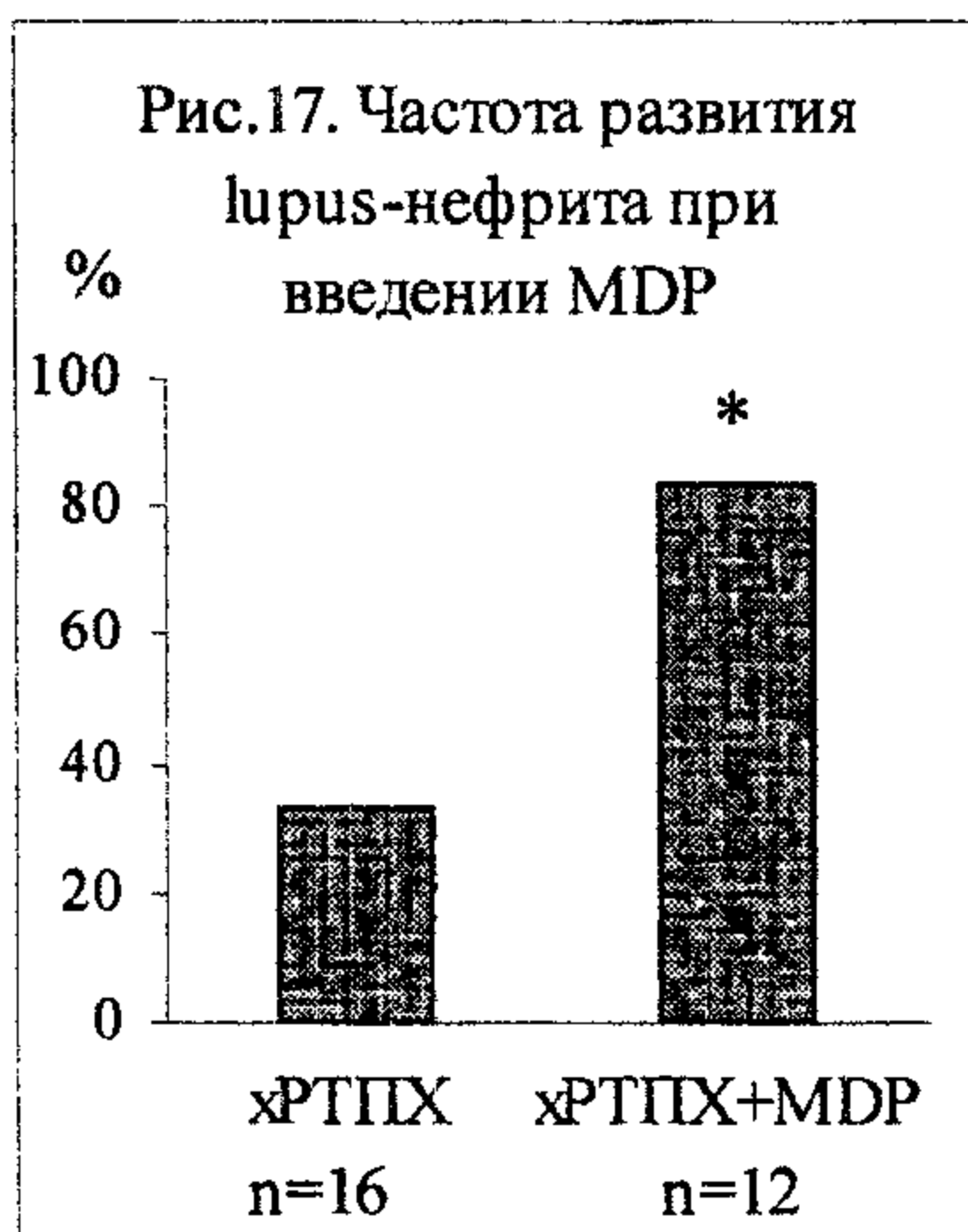
Исходя из предположения, что разные варианты развития хронической РТПХ в изучаемой нами модели связаны с преимущественной активацией Th1- или Th2 клеток, мы попытались изменить течение реакции, влияя на соотношение Th1/Th2 с помощью агентов, специфически активирующих Th1- или Th2-клетки, с разным механизмом действия. Все препараты вводили только во время индукции реакции (первые 2 недели при трансплантации клеток); результаты оценивали по изменению соотношения nonlupus/lupus

мышей в конце эксперимента через 3 месяца после переноса полуаллогенных клеток.

Для сдвига соотношения Th1/Th2 в сторону Th1 использовали введение плазмиды pUC19, обладающей способностью стимулировать продукцию IL-12 [Carson D. A. et al., 1997; Krieg A.M., 1999], или дегидроэпиандростерон-сульфата (DHEA-S), который также является стимулятором Th1-клеток [Araghi-Niknam M. et al., 1997]. В опытных группах отмечается значительное снижение частоты развития гломерулонефрита (рис.15 и 16).



Для изучения возможности изменения течения реакции в противоположном направлении – в сторону активации Th2-зависимых процессов использовали мурамилдипептид (MDP), дериват клеточной стенки бактерий, усиливающий стимулирующее влияние IL-4 на активированные В-лимфоциты [Souvannavong V. et al., 1990]; бисфенол А (BPA), обладающий способностью связываться с рецепторами к эстрогену, вызывая снижение продукции IFN-γ и синтеза IgG2a [Sawai C. et al., 2003]; пентоксифиллин (PTX), ингибирующий продукцию провоспалительных цитокинов, в том числе IFN-γ [Okuda Y. et al., 1996]. Все препараты достоверно увеличивали частоту развития гломерулонефрита. В качестве примера на рис. 17 и 18 приведены результаты действия MDP: возрастает доля lupus-реципиентов и увеличивается соотношение подклассов IgG1/IgG2a, что подтверждает сдвиг Th1/Th2 в сторону Th2.



Таким образом, результаты экспериментов с агентами, специфически активирующими Th1- или Th2-клетки, подтверждают ключевую роль соотношения Th1/Th2 в определении пути развития хронической РТПХ.

***Возможность использования данной модели для тестирования препаратов.***

Современные знания о патогенезе многих заболеваний, связанных с нарушением иммунных процессов при рассогласовании Th1/Th2-регуляторных влияний и баланса соответствующих цитокинов, диктуют необходимость поиска новых иммуноактивных препаратов, в том числе среди синтетических веществ. По данным патентной информации, к числу новых химических соединений, перспективных для создания оригинальных лекарственных средств иммуотропного действия, могут быть отнесены синтетические средства из группы производных арилгетероалканкарбоновых кислот. К этой группе относится соединение ВМ-7-02 (трис-(2-гидроксиэтил) аммониевая соль 1-бензилиндолил-3-тиоуксусной кислоты), полученное в Иркутском Институте органической химии им. А.Е.Фаворского СО РАН и любезно предоставленное нам д.х.н., профессором А.Н.Мирсковой.

При изучении свойств данного соединения было показано, что оно подавляет число IgM-АОК в селезёнке, но не влияет на выраженность ГЗТ при ответе на ЭБ. Культивирование клеток селезёнки с препаратом приводило к депрессии пролиферативного ответа В-клеток на митоген. Введение препарата сдвигало соотношение подклассов IgG в сторону IgG2a. Полученные результаты позволили

рассматривать соединение ВМ-7-02 как иммунодепрессант с селективным действием, эффективно подавляющим Th2-зависимую активацию В-клеток.

Исследование препарата в модели хРТПХ показало, что частота развития *Iuris*-нефрита снижается от 33.3% до 16.7%, концентрация белка в моче изменяется от 2.2 мг/мл до 1.6 мг/мл, соответственно, в контрольных и опытных группах. Таким образом, выявленный на модели хРТПХ эффект препарата на соотношение Th1/Th2 хорошо согласуется со всеми иммуномодулирующими свойствами этого соединения и позволяет предсказать его воздействие на иммунную систему в условиях *in vivo*.

*Механизмы развития разных вариантов хронической РТПХ у генетически однородных реципиентов.*

Известно, что некоторые гормоны, нейромедиаторы, биологически активные вещества (кортикостероиды, норадреналин, простагландины и др.) влияют на активность Th1- и Th2-клеток противоположно направленным образом [Daynes R.A. et al., 1989; Betz M., 1991; Mason D., 1991]. Разный уровень таких веществ в организме может приводить к преимущественной стимуляции Th1- или Th2-клеток. Таким образом, выбор того или иного пути развития хронической РТПХ наряду с другими факторами может определяться исходным индивидуальным гормональным статусом, который не может быть одинаковым у всех особей, несмотря на их генетическую идентичность. В условиях вивария мыши содержатся в клетках по 10 животных, между ними устанавливается социальная иерархия, что определяет их поведенческие реакции, двигательную активность и сопровождается в том числе и стрессовыми реакциями [Дьюсбери Д., 1981]. Кроме того, хРТПХ индуцировалась у самок, которые имеют индивидуальные несинхронизированные половые циклы, сопровождающиеся резким изменением уровня половых гормонов и кортикостерона в течение цикла [Журавлёва Т.Б. с соавт., 1976]. Для проверки предположения о том, что гормональный статус животных и их физическая активность могут быть важными факторами, обуславливающими фенотипическую разнородность иммунных реакций генетически идентичных особей, мы изучили их влияние на выбор того или иного пути развития хронической РТПХ.

*Изучение гормонального статуса реципиентов с разными вариантами хронической РТПХ.*

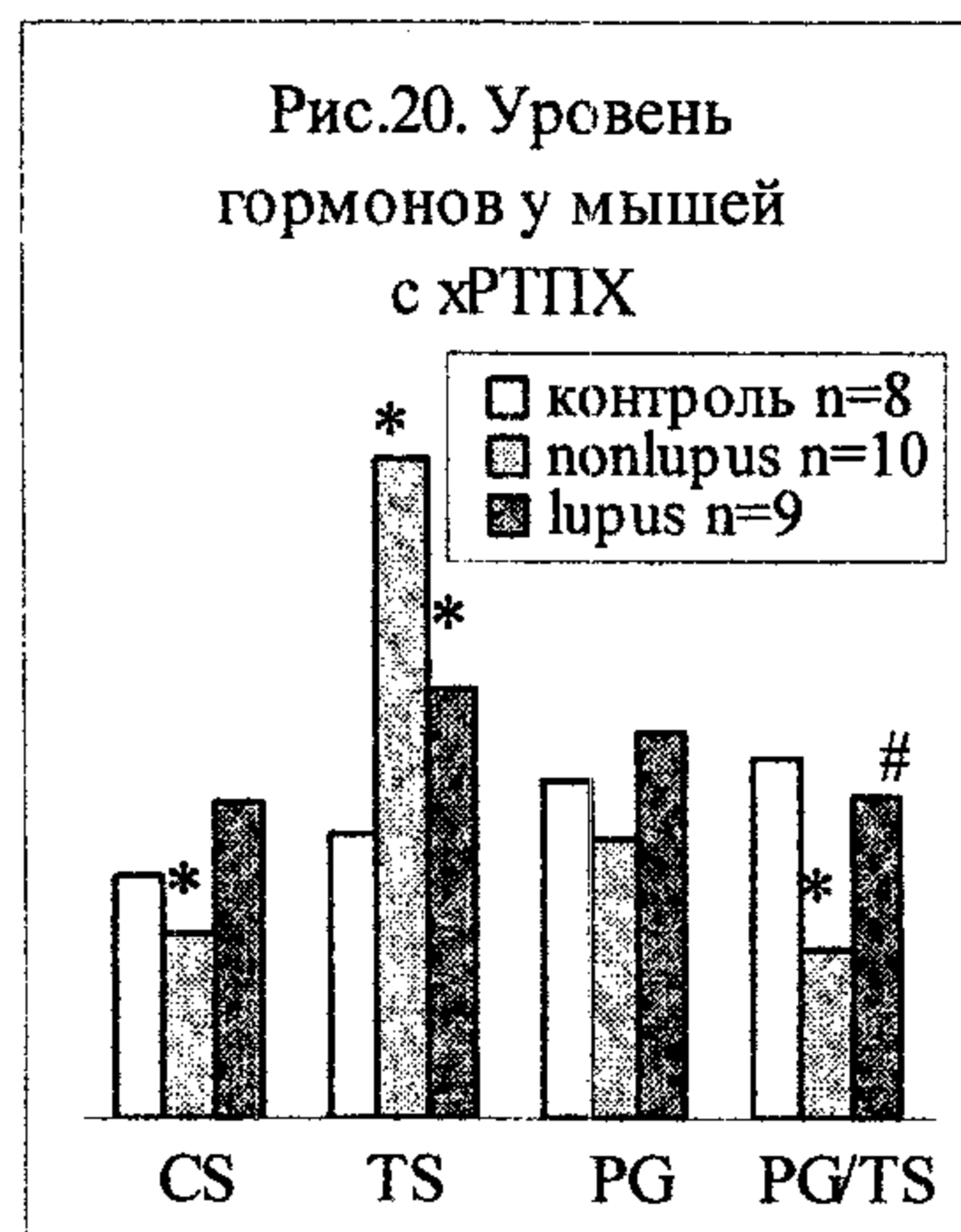
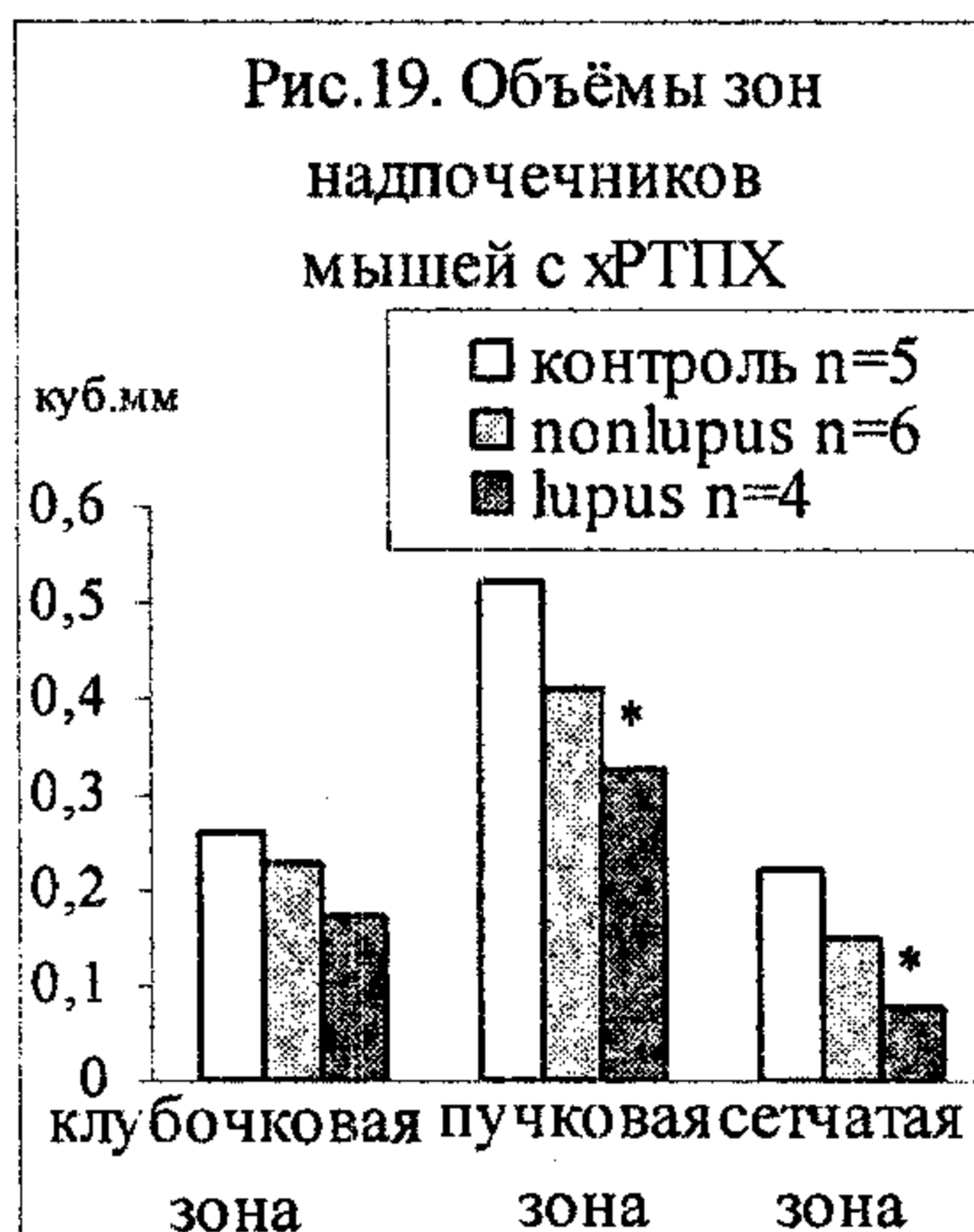
В литературе имеются данные клинических и экспериментальных наблюдений о роли эстрогенной стимуляции в развитии СКВ; показано ингибирующее влияние тестостерона на продукцию



аутоантител [Treurniet R.A et al., 1993; Van Greinsven M. et al., 1997; Whitacre C.C., 2001]. Кроме того, известно, что некоторые гормоны, в частности кортикостерон и прогестерон, активируют Th2-клетки, которые в изучаемой модели обуславливают развитие аутоиммунного гломерулонефрита [Conkad D.M., 1990; Betz M., 1991; Almawi W.Y. et al., 1999; Kohm A.P. et al., 1999, 2000].

В связи с этим представлялось необходимым изучить уровень кортикостерона и половых гормонов для выяснения возможных гормон-опосредованных механизмов развития у генетически однородных реципиентов разных вариантов хРТПХ.

Морфологическое изучение надпочечников, которое проводили в конце эксперимента через 6 месяцев после индукции хРТПХ, показало, что у мышей с протеинурией общий объем надпочечника, объем коры в целом и ее отдельных зон – пучковой и сетчатой - достоверно снижены по сравнению с контролем (рис. 19). Как известно, пучковая зона является источником продукции глюкокортикоидных гормонов, а клетки сетчатой зоны синтезируют половые стероиды. Уменьшение объемов структурно-функциональных зон и замена эпителиальных клеток соединительной тканью, также наблюдаемая у *lupus*-мышей, могут указывать на снижение функций железы, как гормон-синтетической (за счет уменьшения количества секреторных клеток), так и секреторной (за счет склеротических изменений в интерстиции и стенке кровеносных капилляров), что может являться следствием функционального истощения надпочечников у мышей *lupus*.



Обнаруженные межгрупповые различия в изменении уровня кортикостерона (КС), тестостерона (ТС) и прогестерона (ПГ)

подтверждают предположение о роли индивидуальных вариаций глюкокортикоидных и половых гормонов в определении того или иного пути развития хРТПХ (рис.20; абсолютные значения концентраций разных гормонов и отношение уровней прогестерона и тестостерона представлены в разном масштабе, чтобы сравнить степень их изменения на одном рисунке).

Таким образом, lupus-реципиенты характеризуются повышенным уровнем КС по сравнению с nonlupus-мышами; для них характерно также более выраженное преобладание продукции женских половых гормонов над мужскими. Поддержкой последнего предположения могут служить данные по увеличению частоты развития lupus-нефрита на фоне введения реципиентам препарата ВРА, имитирующего действие эстрадиола (приведены выше). Напротив, введение реципиентам-самкам мужских половых гормонов (фармакологического препарата омнадрен) вызывает существенное снижение частоты lupus-нефрита (с 80% до 55%).

*Влияние физических нагрузок на развитие хронической РТПХ.*

Другим параметром, обеспечивающим фенотипическую гетерогенность реципиентов, может быть разный уровень их двигательной активности, определяющий особенности энергетики и, соответственно, уровень физиологических отправлений различных вегетативных систем органов и организма в целом [Аршавский И.А., 1982]. Иммунная система реагирует на изменение физической активности с первых минут резким перераспределением клеток в организме (так называемый «лейкоцитоз физических упражнений»). Дальнейшие реакции зависят от интенсивности, длительности, вида нагрузок и представляют собой широкий спектр самых разнообразных проявлений – от стимуляции защитных реакций до резкого угнетения иммунных процессов, что может быть обусловлено стресс-индуцированными вариациями гормонального фона, изменением уровня энергетических субстратов, используемых клетками иммунной системы, колебаниями уровня и соотношения иммунорегуляторных цитокинов, в продукции которых принимает участие и мышечная ткань (Bagby G.D. et al., 1996; Ostrowski K. et al., 1998).

Так как данные о влиянии физических нагрузок на иммунные реакции немногочисленны и очень противоречивы, было изучено влияние регулярных физических тренировок различной продолжительности на функциональные параметры иммунной системы в опытах *in vitro* и *in vivo*. В качестве физической нагрузки было выбрано плавание без груза различной продолжительности.

Рис.21. Пролиферативный ответ клеток селезёнки в культуре *in vitro* при физических нагрузках

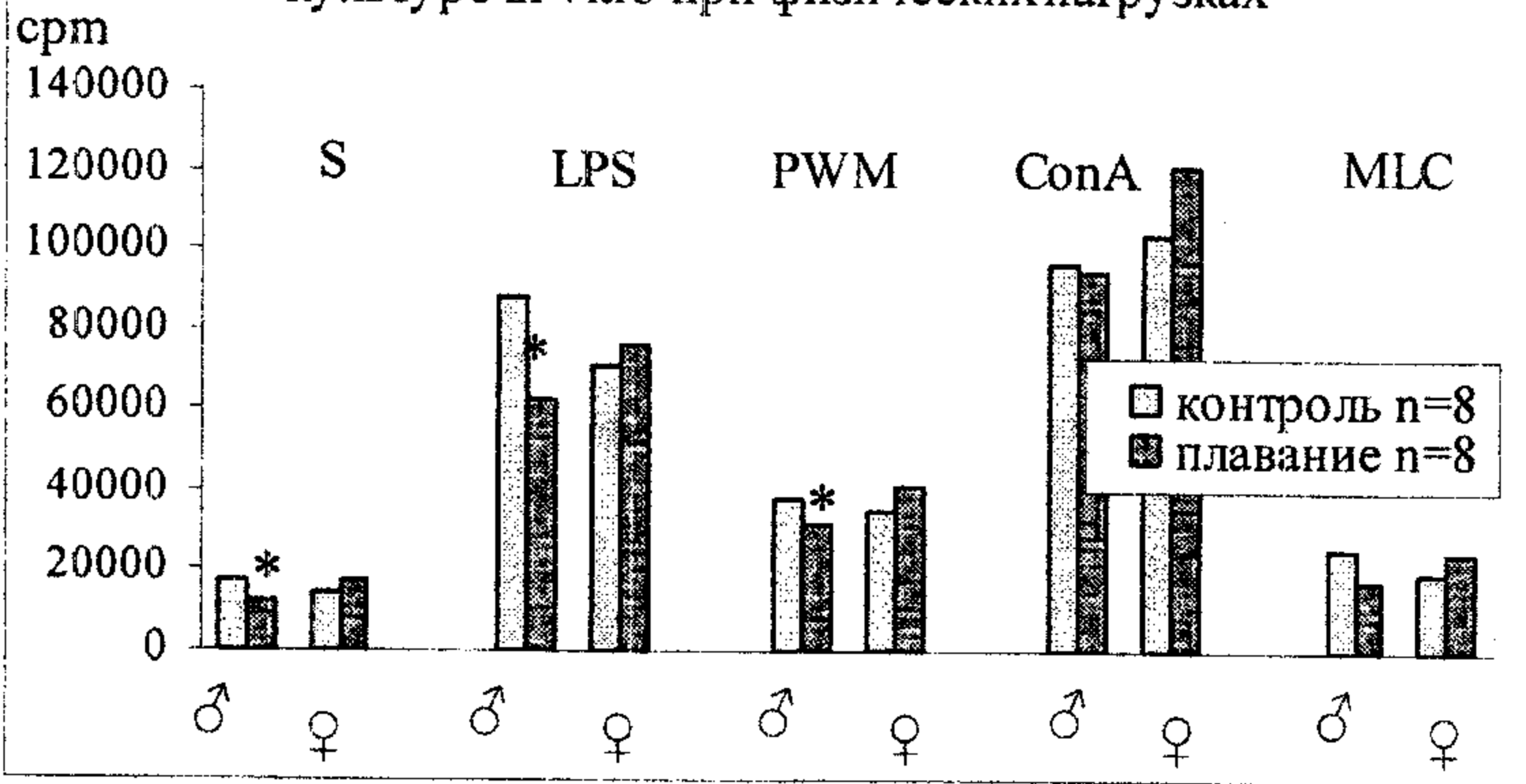
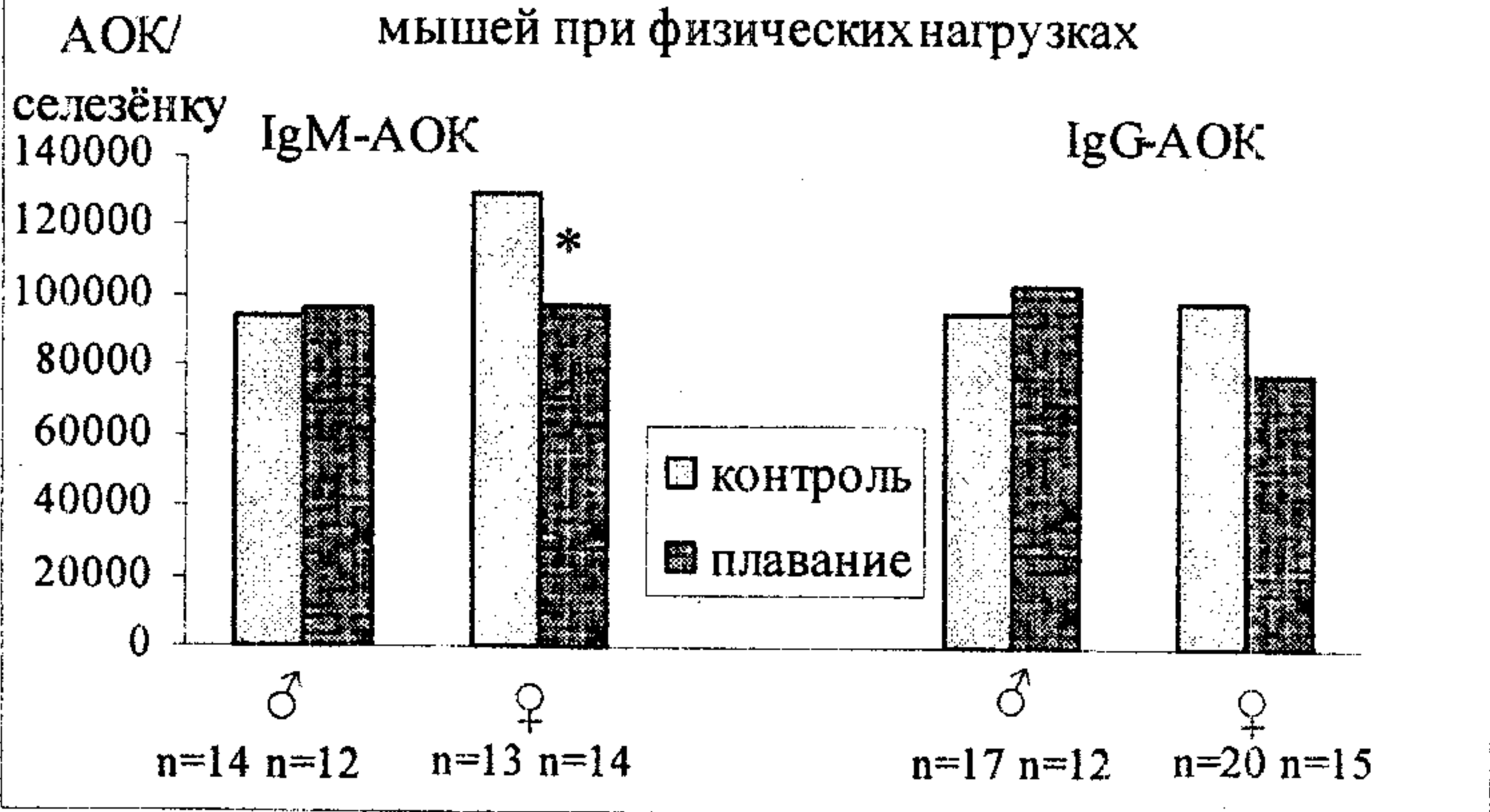
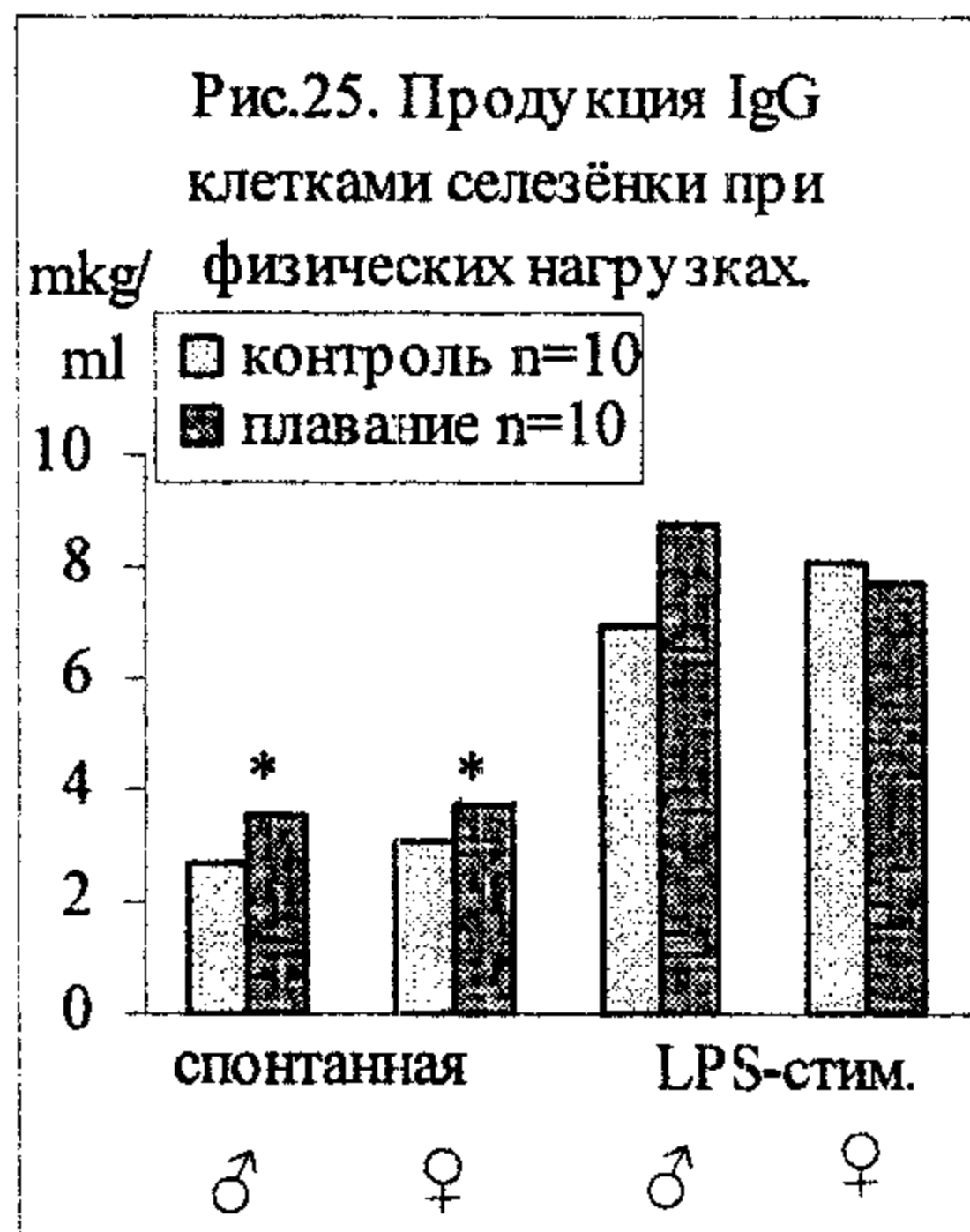
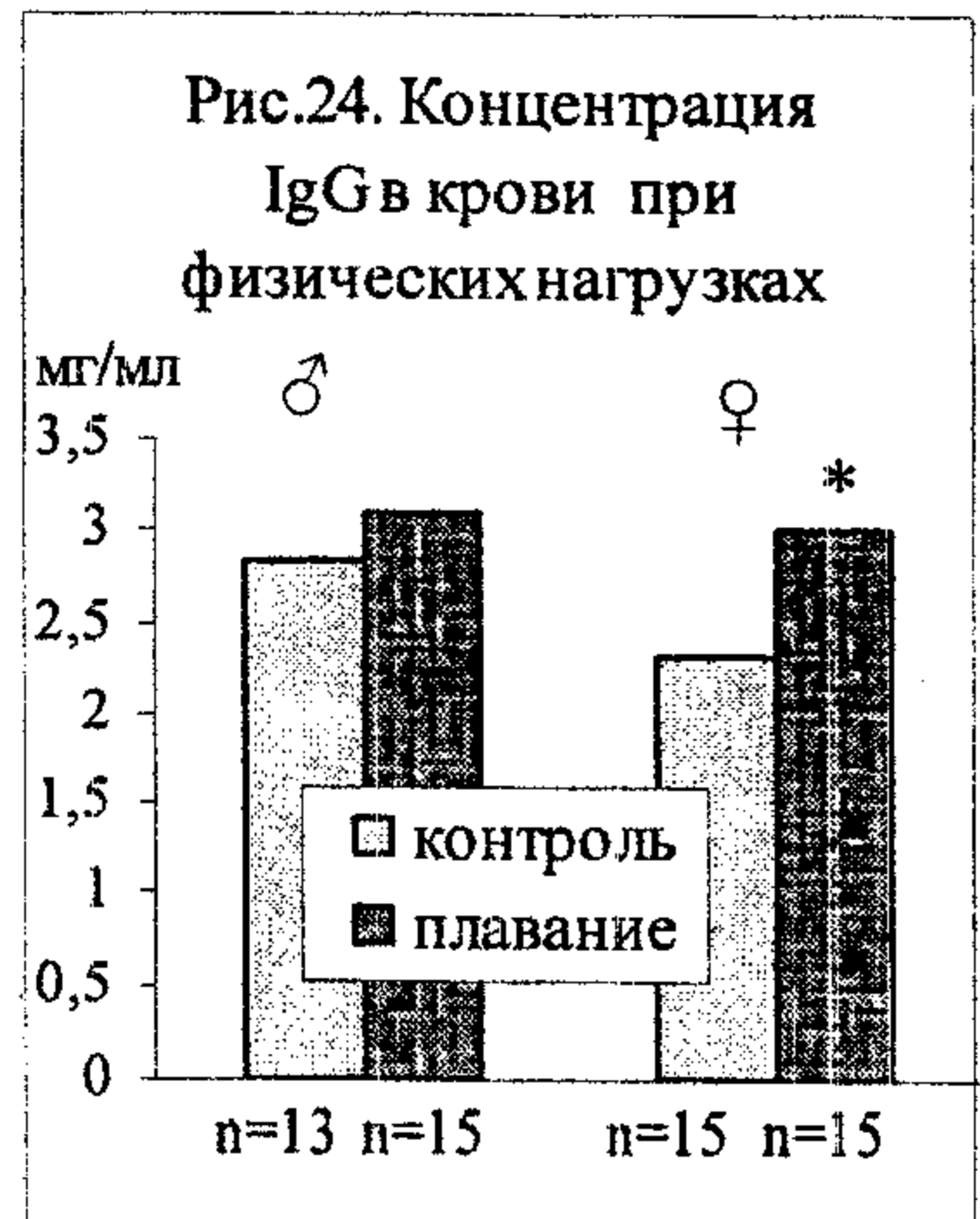
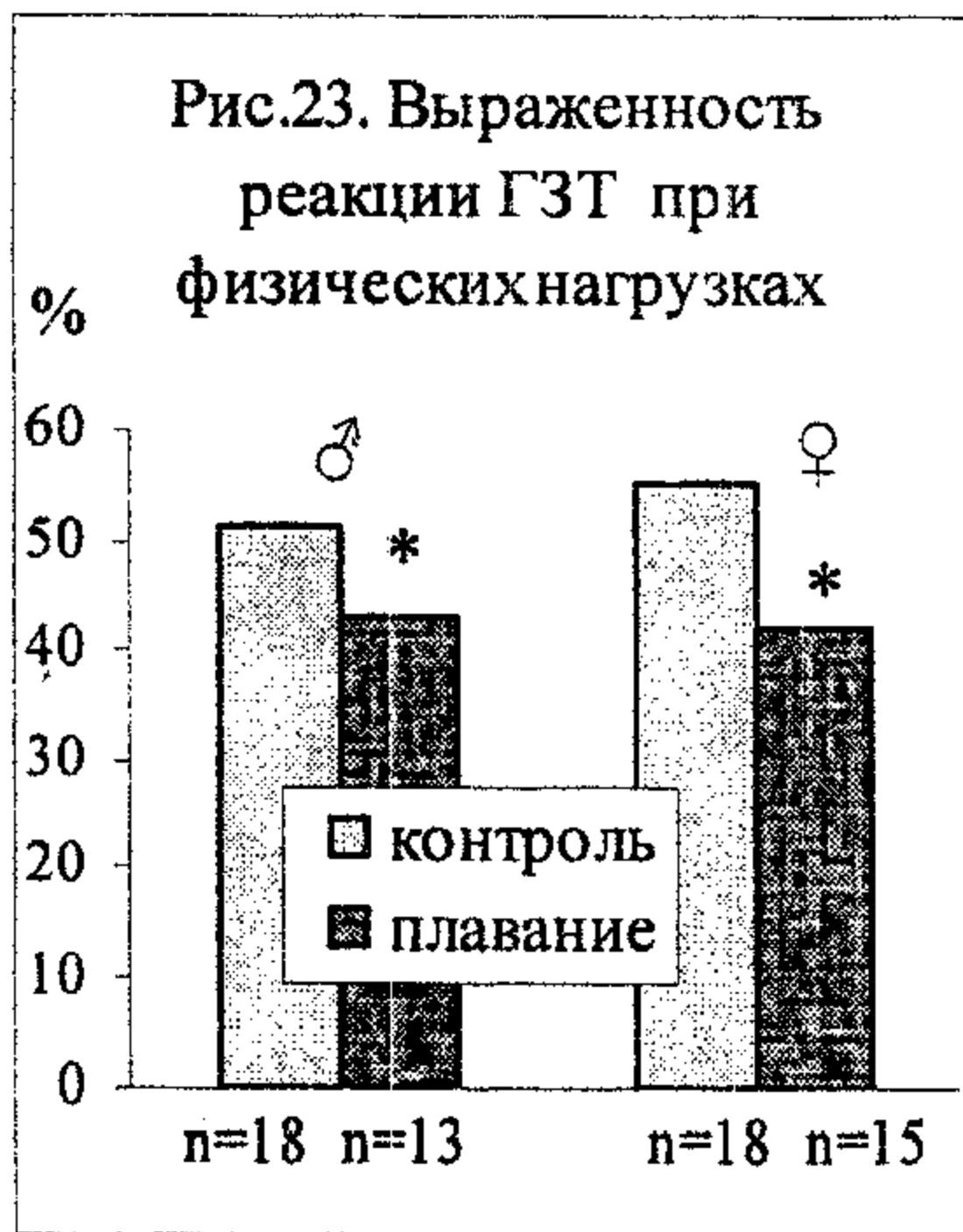


Рис.22. Первичный ответ на Т-зависимый антиген мышей при физических нагрузках



Было обнаружено, что плавание в течение одного часа 5 раз в неделю 3-4 месяца не меняет значительно параметры иммунной системы. Увеличение продолжительности плавания до двух часов приводит после 3-4 месяцев тренировок к возрастанию концентрации IgG в периферической крови, усилению продукции IgG клетками костного мозга и селезёнки, снижению функциональной активности лимфоцитов, что определялось в опытах *in vivo* и *in vitro* (рис. 21 – 26). Наблюдаются изменения формулы крови: возрастает доля лимфоцитов и появляются плазматические клетки, что может служить дополнительным подтверждением активации В-клеток, приводящей к

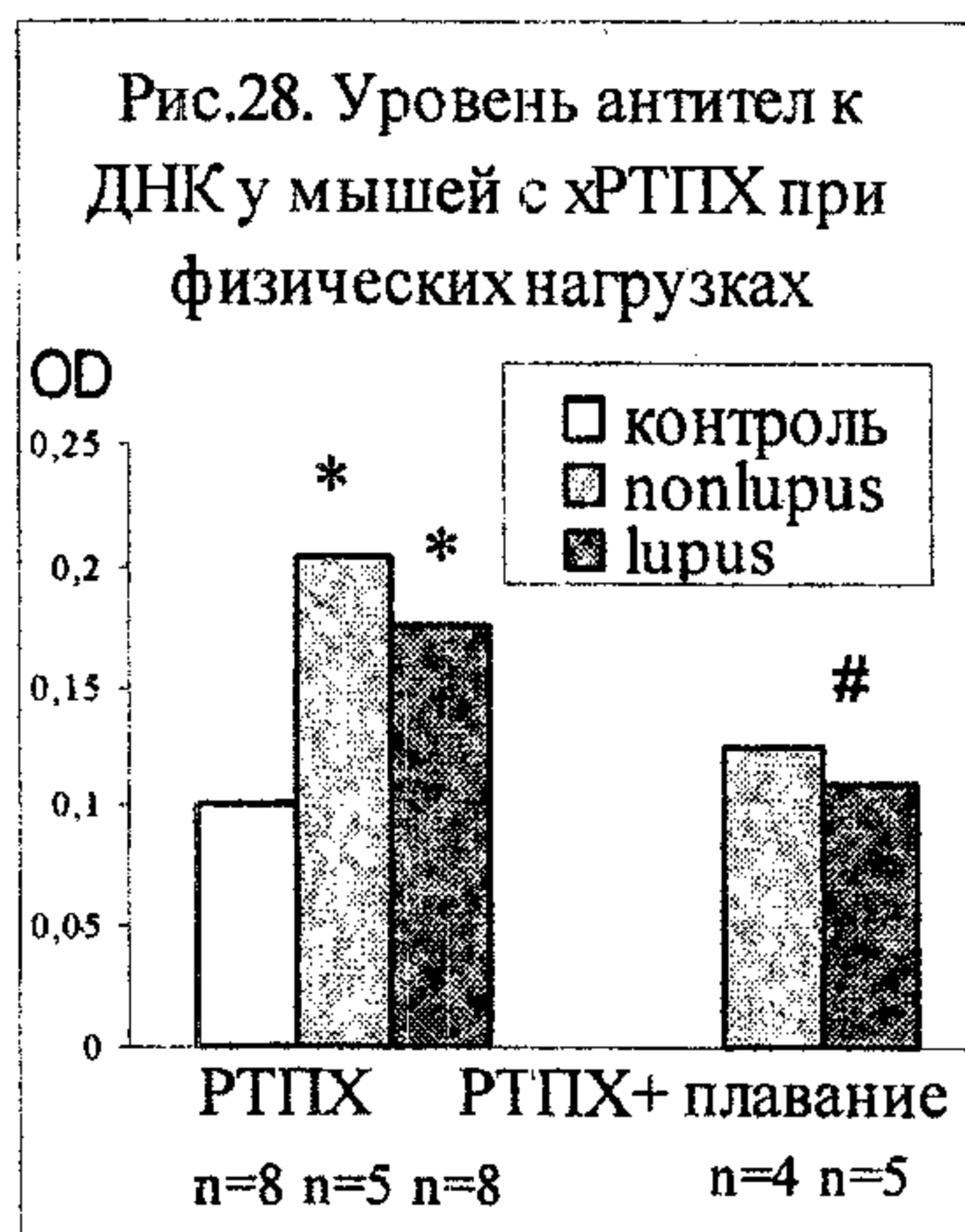
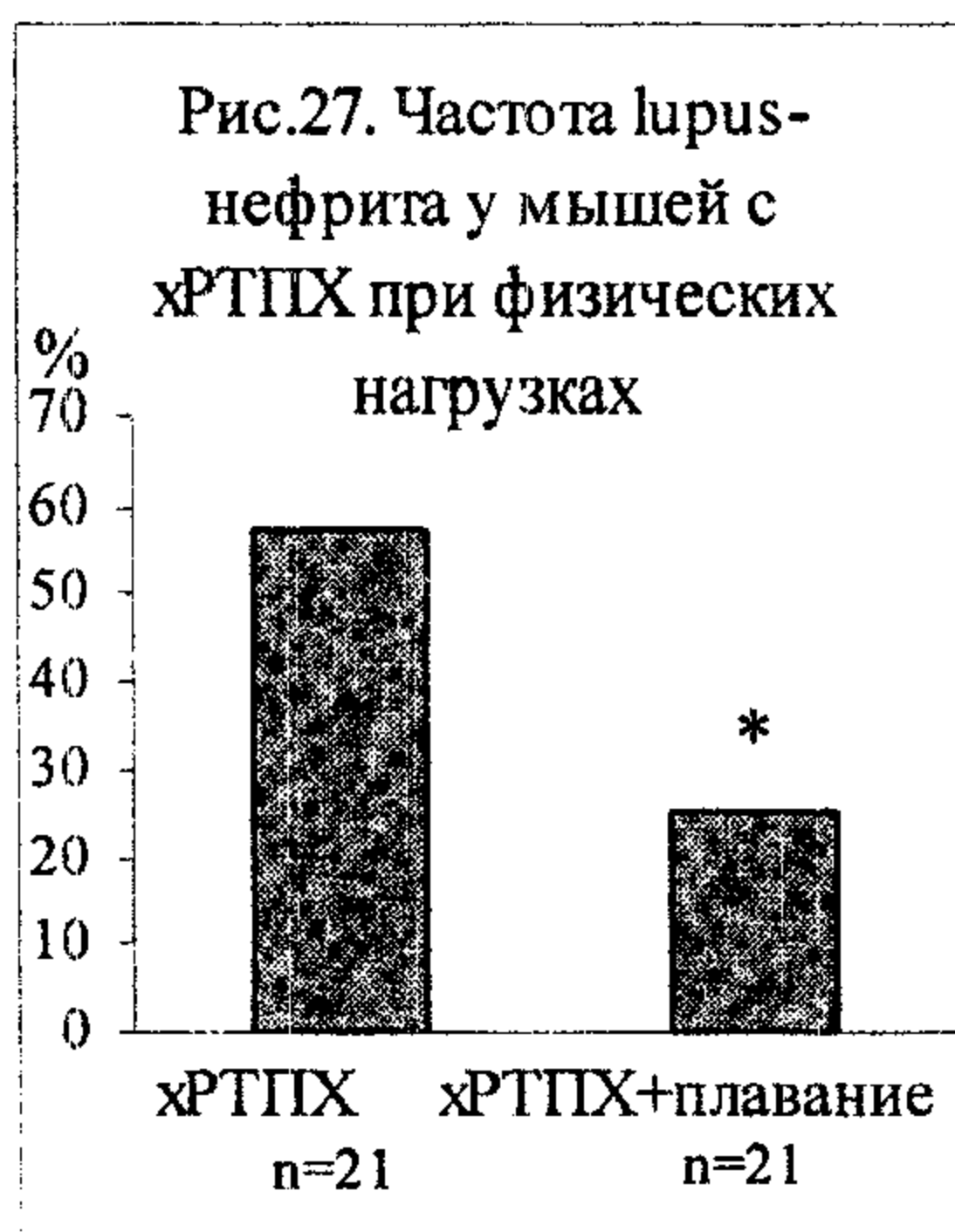
подъёму уровня иммуноглобулинов крови. Необходимо отметить, что реакция на физические тренировки зависит от пола экспериментальных животных



Увеличение продолжительности тренировок до 4-5 часов приводит к более выраженными изменениям иммунных параметров. У мышей наблюдается гиперплазия селезёнки, резкое снижение пролиферативного ответа на Т- и В-клеточные митогены, но при этом уровень иммуноглобулинов в сыворотке продолжает оставаться повышенным.

Для изучения возможного влияния регулярных физических тренировок на частоту развития клинических вариантов хронической РТПХ мышей подвергали ежедневному плаванию в течение продолжительного периода при нагрузках средней интенсивности (два часа 5 раз в неделю на протяжении 2-3-х месяцев до индукции и 3-х месяцев после индукции хРТПХ).

Было обнаружено, что регулярные физические тренировки умеренной интенсивности уменьшают относительную долю lupus-реципиентов (рис.25). Изменение частоты развития lupus-нефрита сопровождается снижением титра антител к ДНК у lupus-пловцов (рис. 26). Таким образом, физические нагрузки являются одним из факторов, меняющих условия Th1/Th2- поляризации в организме.



Полученные результаты свидетельствуют, что гормональный статус, в частности, уровень кортикостерона и соотношение половых стероидов, и двигательная активность входят в число факторов, обеспечивающих фенотипическую гетерогенность баланса Th1/Th2 у генетически идентичных реципиентов

Исследованная в работе модель хронической РТПХ, индуцированная в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6хDBA/2)F1, приводит к развитию двух отличных в клиническом отношении иммунопатологических состояний, формирование которых определяется относительным превалированием Th1- или Th2-клеток и находится под контролем регуляторных систем целостного организма. Использование этой модели позволяет изучать механизмы возникновения

иммунодефицитных и аутоиммунных нарушений, способы их коррекции и проводить скрининг потенциальных иммуномодулирующих агентов.

## **ВЫВОДЫ.**

1. Реакция «трансплантат против хозяина», индуцированная в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6хDBA/2)F1 и обладающая характерными для хронической формы РТПХ признаками (спленомегалия, отсутствие атрофии тимуса, поликлональная активация В-лимфоцитов), приводит к формированию двух клинических исходов, определяемых преимущественной активацией Th1- либо Th2-клеток, что говорит о существовании двух вариантов хронической РТПХ: Th1- или Th2-зависимого типа.

2. Развивающийся у части животных один из вариантов хронической РТПХ характеризуется гипергаммаглобулинемией с преимущественным синтезом IgG2a по сравнению с IgG1, резким подавлением продукции IgM- и IgG-антител в сочетании с нормальным клеточным ответом на Т-зависимый антиген, что свидетельствует о доминирующей роли Th1-клеток в формировании иммунных реакций при данном течении РТПХ.

3. Другой вариант хронической РТПХ, сопровождающийся развитием гипергаммаглобулинемии с преимущественным синтезом IgG1 по сравнению с IgG2a, снижением функциональной активности Т-клеток и подавлением как клеточного, так и гуморального ответа на Т-зависимый антиген, связан с преобладанием влияния Th2-клеток и приводит к формированию аутоиммунной патологии – люпус-подобного иммунокомплексного гломерулонефрита.

4. Введение агентов, специфически активирующих Th1- или Th2-клетки, направляет развитие хронической РТПХ по одному из возможных вариантов, соответственно снижая или увеличивая вероятность развития гломерулонефрита, что подтверждает ключевую роль Th1/Th2-соотношения в определении пути развития хронической РТПХ.

5. Вероятность возникновения определённого варианта хронической РТПХ зависит от индивидуального гормонального статуса реципиента: повышенный уровень кортикостерона и женских половых гормонов предрасполагают к развитию Th2-зависимого варианта реакции, в то время как тестостерон и дегидроэпиандростерон увеличивают частоту развития Th1-зависимого варианта.

6. Поликлональная активация В-клеток костного мозга и селезёнки мышей, возникающая при регулярных физических тренировках умеренной интенсивности, сохраняется при истощающем режиме тренировок, который приводит к глубокому подавлению других функциональных реакций клеток иммунной системы.

7. Индукция хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6хDBA/2)F1 на фоне регулярных физических тренировок реципиентов сопровождается снижением частоты развития иммунокомплексного гломерулонефрита, свидетельствуя об изменении условий Th1/Th2-поляризации под влиянием физических нагрузок.

8. Развитие хронической реакции «трансплантат против хозяина» в полуаллогенной системе DBA/2→(C57BL/6хDBA/2)F1 находится под регулирующим действием эпигенетических факторов, эффект которых опосредуется изменением соотношения Th1/Th2 клеток.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации.**

1. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Логинов В.А., Робинсон М.В., Колесникова С.М., Козлов В.А. Показатели эритро- и иммунопоза в развитии аутоиммунных заболеваний, индуцированных хронической реакцией трансплантат против хозяина.// Вестн.АМН СССР. – 1991. – 12. – С.13-16.

2. Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Войчук М.Т. Гуморальный иммунный ответ при разных вариантах иммунодефицита, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина.// Тез. докл. I съезда иммунологов России. – 1992. – С.257.

3. Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Сафронова И.В. Варианты иммунодефицита, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина (GVH).// Ланималогия. - 1993. - № 1. - С. 69.

4. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Тузова М.Н., Сухенко Т.Г., Козлов В.А. Модель аутоиммунного заболевания, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина.// Ланималогия.- 1993. - № 1. - С. 64.

5. Ширинский В.С., Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Сухенко Т.Г., Тузова М.Н., Семёнова Н.В. Иммуноактивные свойства трекрезана.// Эксперим. Клин. Фармакол. – 1993. – № 3. – С.42-45.

6. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Тузова М.Н., Сафронова И.В., Мирскова А.Н., Левковская Г.Г., Козлов В.А. К вопросу о механизмах иммуномодулирующего эффекта производных алканкарбоновых кислот.// Иммунология. – 1994. - № 5. - С. 30-33.

7. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Тузова М.Н., Сафронова И.В., Мирскова А.Н., Левковская Г.Г., Козлов В.А. Механизмы иммуномодулирующего эффекта германийорганических соединений.// Иммунология – 1995. - № 1. - С.27-31.
8. Kudaeva O., Saphronova I., Tuzova M. The development of immunodeficiency or autoimmune pathology in mice with graft-versus-host reaction. // Scand. J. Immunol. – 1996. – V. 43. – N. 6. – P. 716.
9. Колесникова О.П., Тузова М.Н., Сафронова И.В., Кудаева О.Т., Козлов В.А. Изучение эффекта производных индолил 3 ацетата и германийорганических соединений на модели аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина.// Иммунология. – 1996. - № 3. - С. 43-46.
10. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Т.Г. Сухенко, Сафронова И.В., Козлов В.А. РТПХ-индуцированные экспериментальные модели патологии иммунной системы. // Научный отчет ИКИ СО РАМН. – Новосибирск, 1997. – С. 38-39.
11. Saphronova I., Kudaeva O., Kolesnikova O., Kozlov V. The mechanism of development of autoimmune pathology using a model.// Conference on Genetic aspects of autoimmune diseases 7-10 May 1998. Noordwijkerhout the Netherlands. - Abstract Book.- P.16.
12. Kolesnikova O.P., Levkovskaya G.G., Kudaeva O.T., Sukhenko T.G., Saphronova I.V., Kozlov V.A. Immunoactive properties of indolil-3-ylthioacetate tris-(2-hydroxyethyl)ammonium.// Abstr. Int. Conf. on Natural Products and Physiologically Active Substances. – Novosibirsk., 1998. – P.99.
13. Козлов В.А., Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Тузова М.Н., Ширинский В.С., Мирскова А.Н., Левковская Г.Г., Сухенко Т.Г. Иммуномодулятор.// Патент №2108100. – 1998.
14. Кудаева О.Т., Сафронова И.В., Колесникова О.П., Козлов В.А. Развитие иммунных нарушений при интенсивных физических нагрузках.// Russian J. Immunol. – 1999. - Vol. 4., Suppl. 1. - P. 35.
15. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Сухенко Т.Г., Сафронова И.В., Мирскова А.Н., Левковская Г.Г., Козлов В.А. O, S, N-содержащие производных алканкарбоновых кислот – новые иммуноактивные средства.// Russian J. Immunol. – 1999. - Vol. 4., Suppl. 1. - P. 99.
16. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Сухенко Т.Г., Сафронова И.В., Козлов В.А. РТПХ-индуцированные модели растройств иммунной системы как экспериментальные модели патологии иммунной системы. // Russian J. Immunol. – 1999. - Vol. 4. - Suppl.1. - p. 135.



17. Сафронова И.В., Логинов В.А., Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Козлов В.А. К механизму развития аутоиммунной патологии в экспериментальной модели.// *Russian J. Immunol.* – 1999. - Vol. 4., Suppl.1. - P. 136.
18. Kozlov V.A., Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Saphronova I.V. The development of immunological disorders during exercise.// *Int. J. Sports Med.* – 2000. – Suppl. 1. – V. 21. – P. 79-80.
19. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Сухенко Т.Г., Сафронова И.В., Козлов В.А. РТПХ-индуцированные экспериментальные модели патологии иммунной системы.// Научный отчёт ИКИ СО РАМН. Новосибирск, 2000. – С. 38-39.
20. Сафронова И.В., Кудаева О.Т., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю., Колесникова О.П., Козлов В.А. Модуляция развития иммунопатологического состояния.// *Аллергология и иммунология.* – 2000. - № 2. - С. 118.
21. Акименко З.А., Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Шушакова А.С. Исследование физико-химических свойств ингибитора стволовой кроветворной клетки, выделенного из мышечной ткани. // Научный отчёт ИКИ СО РАМН. - Новосибирск, 2000. - С.11-14.
22. Rykova E., Safronova I., Kudaeva O., Laktionov P., Vlasov V. Plasmid DNA-induced modulation of autoimmune disease development in graft-versus-host reaction model. // International Conference «RNA as Therapeutic and Genomics Target» - Novosibirsk, 2001. - P.49.
23. Козлов В.А., Сафронова И.В., Кудаева О.Т., Колесникова О.П. Участие интерлейкина-1 в развитии Th1- и Th2-зависимых вариантов хронической реакции «трансплантат против хозяина».// *БЭБМ.* – 2001. – 132. – 8. – С. 185-187.
24. Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Sukhenko T.G., Tuzova M.N., Saphronova I.V. The correction of combined immuno- and hemopoiesis disorders induced by graft-versus-host reaction.// *Russian J. Immunol.* -2001. - V. 6. – N. 2. - P.177-186.
25. Власов В.В., Рыкова Е.Ю., Сафронова И.В., Лактионов П.В., Кудаева О.Т., Козлов В.А. Модуляция течения хронической реакции трансплантат против хозяина.// *ДАН.* – 2002. – 32. – N. 6. – С. 844-846.
26. Козлов В.А., Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Сафронова И.В., Лактионов П.В., Рыкова Е.Ю., Обухова Л.А. Th1- и Th2-зависимые варианты хронической реакции трансплантат против хозяина.// *Иммунология.* – 2002. – 23. – № 3. – С. 143-146.
27. Козлов В.А., Кудаева О.Т. Иммунная система и физические нагрузки (Обзор).// *Мед. Иммунол.* – 2002. - 4. – №3. – 427-438.

28. Лимонов В.Л., Колесникова О.П., Кудаева О.Т. Коррекция производными арилгетероалканкарбоновых кислот РТПХ-индуцированных сочетанных расстройств иммуно- и гемопоэза.// Евразийский мед. журн. - 2003. - №1. - С.95-96.
29. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Сухенко Т.Г., Лимонов В.Л., Козлов В.А., Мирскова А.Н., Воронков М.Г. Трекрезан как модулятор гемо- и иммунопоэза.// ДАН. - 2003. - Т.391. - №3. - С.1-3.
30. Кудаева О.Т., Колесникова О.П. Гормональные механизмы развития хронической РТПХ.// Russian J. Immunol. - 2004. - V. 9., Suppl.1. – P. 15.
31. Мошкин М.П., Акинчина Л.В., Кудаева О.Т., Колосова И.Е., Козлов В.А. Влияние запаха самок на иммунитет, эндокринный статус и агрессивное поведение самцов лабораторных мышей.// Иммунология. – 2004. – № 6. – С.350-354.
32. Кудаева О.Т., Колесникова О.П. Патологические механизмы иммунных нарушений и баланс про- и противовоспалительных цитокинов: модель РТПХ (Обзор).// В: Система цитокинов. Теоретические и клинические аспекты. Под ред. В.А.Козлова, С.В.Сенникова. Новосибирск, 2004. – С.255-268.
33. Гаврилова Е.Д., Кудаева О.Т., Колесникова О.П. Регуляторные взаимодействия между клеточным и гуморальным иммунным ответом при формировании иммунной памяти.// Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 2. – С.83.
34. Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Сухенко Т.Г., Вежан О.В., Гойман Е.В., Лыков А.П. Влияние длительной физической тренировки на иммунные реакции *in vitro* и *in vivo* у экспериментальных животных.// Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 2. – С.85.
35. Гайдуль К.В., Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Лимонов В.Л., Гольдина И.А., Сафронова И.В., Лыков А.П., Милакин С.Б., Гойман Е.В. Методология скрининга селективных иммунодепрессантов.// Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 2. – С.116.
36. Гойман Е.В., Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Лыков А.П. Модуляция Th1- или Th2-зависимого развития хронической реакции трансплантат против хозяина.// Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 2. – С.116-117.
37. Litvinova E.A., Kudaeva O.T., Mershieva L.V., Moshkin M.P. High level of circulating testosterone abolishes decline in scent attractiveness in antigen-treated male mice.// Animal Behaviour. – 2005. – 69. – P.511-517.

Подписано в печать 09.09.2005 г.  
Формат 60\*84/16. Объем 2,0 п.л. Тираж 80 экз. Заказ 142/05.  
Отпечатано ООО ИПП «Art-Avenue»  
Новосибирск, ул. Институтская, 4/1 – 504.  
Тел. (383) 330-38-34, 223-23-40, 291-18-27