

В. О. Ткачев, Н. Н. Вольский, О. Т. Кудяева, В. А. Козлов

ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ "ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА": СВЯЗЬ С ТН1/ТН2-ПОЛЯРИЗАЦИЕЙ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Изучена взаимосвязь кислородного метаболизма нейтрофилов периферической крови с вариантом течения хронической реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ). Установлено, что увеличение продукции активных кислородных метаболитов (АКМ) на ранних сроках после индукции сопровождается преимущественным развитием РТПХ по Th2-зависимому варианту, приводящему к развитию аутоиммунного поражения почек. Снижение продукции АКМ, напротив, повышает частоту развития Th1-зависимого варианта хронической РТПХ. Полученные данные свидетельствуют о наличии закономерной взаимосвязи между активностью кислородного метаболизма клеток иммунной системы и направлением девиации иммунного ответа.

The objective of this study was to investigate the relationship between oxygen metabolism in peripheral neutrophils and the character of the chronic "graft-versus-host" reaction. Enhanced production of active oxygen metabolites (AOM) soon after induction was found to be associated with the development of the predominantly Th2-dependent "graft-versus-host" reaction leading to an autoimmune renal disease. Conversely, a fall in AOM production gave rise to a Th1-dependent variant of the chronic "graft-versus-host" reaction. These data suggest correlation between the immune response and the intensity of oxygen metabolism in immune cells.

Воспроизводимая на мышях DBA/2 → (C57Bl/6хDBA/2)F1 хроническая реакция "трансплантат против хозяина" (РТПХ) является, как это было показано нами ранее [2], удобной экспериментальной моделью, позволяющей изучать феномен Th1/Th2-поляризации в условиях естественно развивающегося иммунопатологического процесса. В частности, она дает возможность оценить влияние различных факторов, определяющих направление, по которому будут развиваться иммунные реакции, и исследовать механизмы их воздействия на Th1/Th2-баланс.

В настоящей работе была изучена взаимосвязь между активностью супероксидпродуцирующих ферментов в клетках иммунной системы и частотой Th1- и Th2-зависимых вариантов развития хронической РТПХ. С этой целью параметры окислительного метаболизма клеток оценивались на фоне введения экспериментальным животным дегидроэпиандростерона сульфата (DHEA-S) и мурамилдипептида (MDP), которые, согласно ранее полученным данным [1, 3], способны существенно влиять на Th1/Th2-поляризацию в условиях данной модели.

Материалы и методы. В работе использовались самки мышей линии DBA/2 и гибриды (C57Bl/6хDBA/2)F1 в возрасте 2 мес, полученные из питомника СО РАМН и содержащиеся в стандартных условиях вивария.

Хроническую РТПХ у мышей-гибридов (C57Bl/6хDBA/2)F1 индуцировали двукратным (с интервалом 6 дней) переносом спленоцитов мышей линии DBA/2 в суммарной дозе $130 \cdot 10^6$ клеток [2]. О развитии гломерулонефрита судили по наличию стойкой протеинурии (не менее 3 мг/мл в двух последовательных измерениях). За момент начала индукции РТПХ принимали дату 1-й трансплантации лимфоидных клеток. В качестве контрольной группы использовали интактных мышей.

DHEA-S ("Sigma", США) вводили в разовой дозе 38 мг на 1 кг массы тела четырехкратно по следующей схеме: за 1 сут до 1-го переноса лимфоидных клеток и далее на 3-и, 5-е и 8-е сутки после начала индукции РТПХ. MDP ("ICN", США) вводили двукратно — в 1-е и на 10-е сутки эксперимента в дозе 1 мг на 1 кг массы тела.

Для оценки активности супероксидпродуцирующих ферментов использовали спонтанный и стимулированный продигозаном НСТ-тест, как это было описано ранее [4]. Кровь животных опытной и контрольной групп забирали из хвостовой вены в первой половине дня в интервале с 11 до 12 ч.

Статистическую обработку проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента и критерия Вилкоксона—Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение. Для исследования взаимосвязи между эффектами биологически активных веществ на процесс Th1/Th2-поляризации в ходе хронической РТПХ и их влиянием на кислородный метаболизм клеток были выбраны MDP — компонент бактериальной стенки и стероидный гормон — DHEA-S. На рис. 1, а, б, показано, что использованные препараты оказывают, как и было обнаружено нами ранее [1, 3], противоположно направленное воздействие на Th1/Th2-переключение при хронической РТПХ. MDP увеличивает число животных с развитием аутоиммунного поражения почек (Th2-зависимого варианта хронической РТПХ), в то время как DHEA-S снижает их количество (по сравнению с контрольной группой).

Прежде чем исследовать влияние DHEA-S и MDP на продукцию супероксидрадикала полиморфноядерными лейкоцитами крови у мышей с хронической РТПХ, эффекты этих веществ были изучены у интактных животных. На рис. 2 показано, что DHEA-S существенно снижает показатели спонтанного НСТ-теста через 2 ч после однократного подкожного введения гормона (38 мг/кг). Это

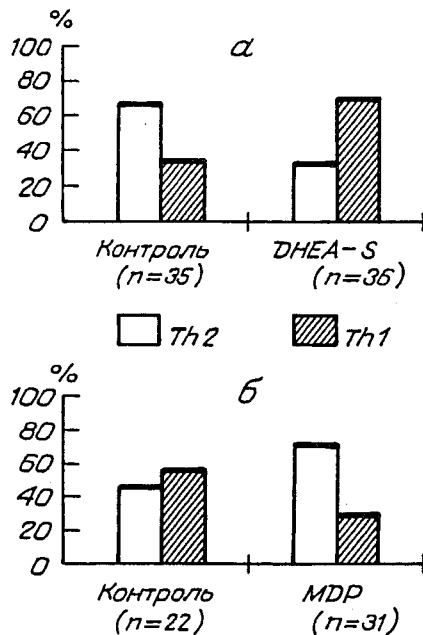


Рис. 1. Влияние DHEA-S (а) и MDP (б) на частоту развития Th1- и Th2-зависимого вариантов хронической РТПХ.

По оси абсцисс — группы экспериментальных животных; по оси ординат — частота (в %) развития клинического варианта хронической РТПХ.

совпадает с результатами, полученными нами ранее в опытах с тимоцитами и спленоцитами мышей [1], и с данными литературы, свидетельствующими о наличии у DHEA-S антиоксидантных свойств [10]. Гормон снижает только число клеток, спонтанно генерирующих супероксидный радикал (стимулированная продигиозаном продукция достоверно не изменяется), и через 5 ч после его введения этот показатель возвращается на уровень контроля (см. рис. 2, б).

Противоположным образом воздействует на исследованный показатель введение мышам MDP. Данное соединение существенно (более чем в 2 раза через 2 ч после введения и более чем в 1,5 раза через 5 ч) увеличивает содержание в крови нейтрофилов, спонтанно продуцирующих АКМ (см. рис. 2, а, б). Поскольку дополнительная стимуляция клеток продигиозаном практически не увеличивает показателя НСТ-теста у этих животных (как это всегда наблюдается у интактных мышей), можно сказать, что в использованной нами дозе MDP стимулирует окислительный метаболизм нейтрофилов до максимально возможного уровня, определяемого актуальным состоянием клеток.

Влияние DHEA-S и MDP на показатели НСТ-теста (как спонтанного, так и стимулированного) было проверено также через 2 и 4 нед после четырехкратного (DHEA-S) или двукратного (MDP) введения препаратов интактным мышам по схеме, используемой для модуляции хронической РТПХ. Как и следовало ожидать, через такие большие сроки эффекты исследуемых веществ не регистрировались, и все показатели не отличались от соответствующих контролей (данные не приведены).

Совершенно иначе воздействовали эти вещества при введении на фоне индукции хронической

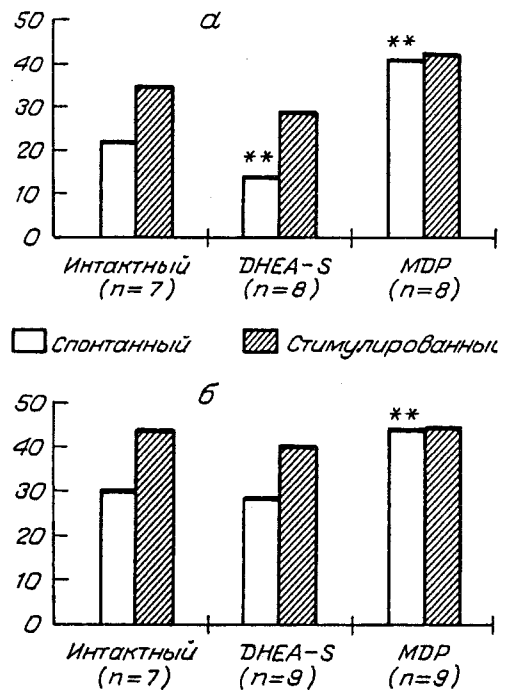


Рис. 2. Влияние DHEA-S и MDP на продукцию активных форм кислорода через 2 ч (а) и 5 ч (б) после введения препарата.

По оси абсцисс — группы экспериментальных животных; по оси ординат — относительное содержание (в %) НСТ-позитивных нейтрофилов. Здесь и на рис. 3, 4: ** — достоверное отличие от интактных животных ($p < 0,01$).

РТПХ. Результаты таких экспериментов представлены на рис. 3 и 4.

Время проведения НСТ-теста у этих животных — 2 и 4 нед после 1-го переноса лимфоидных клеток мышам-реципиентам — было выбрано, исходя из ранее полученных нами данных о том, что именно в такие сроки после индукции хронической РТПХ у мышей обнаруживается стимуляция окис-

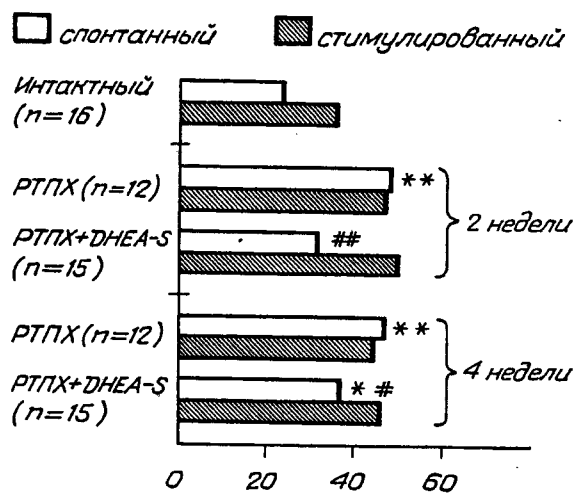


Рис. 3. Влияние DHEA-S на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами крови на ранних сроках после индукции хронической РТПХ.

Здесь и на рис. 4 по оси абсцисс — относительное содержание НСТ-позитивных нейтрофилов (в %), по оси ординат — группы экспериментальных животных. * — достоверное отличие от интактных животных ($p < 0,05$); # — достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$); — достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,01$).

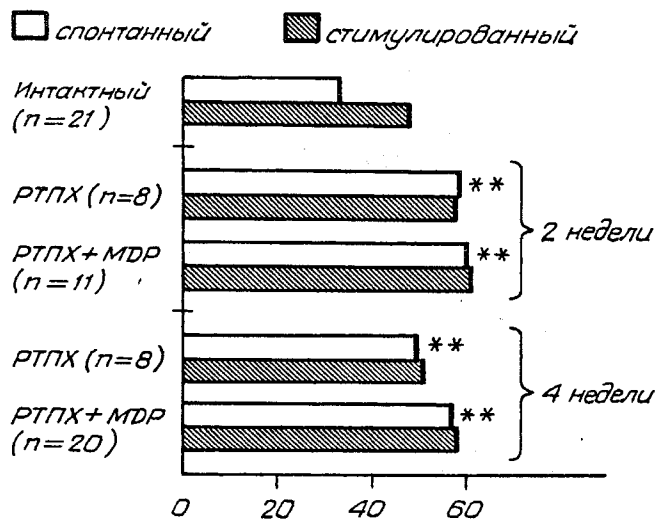


Рис. 4. Влияние MDP на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами крови на ранних сроках после индукции хронической РТПХ.

лительного клеточного метаболизма [4]. Действительно, на рис. 3, 4 видно, что в указанные сроки показатели НСТ-теста у мышей с индукцией хронической РТПХ (без предварительного введения препаратов) значимо выше, нежели у интактных животных ($p < 0,01$). Характерно, что у мышей с РТПХ показатели спонтанного и стимулированного тестов не отличаются друг от друга, свидетельствуя о наличии в организме этих животных таких концентрированных факторов, стимулирующих кислородный метаболизм, которые достаточны для максимальной активации этой функции полиморфноядерных лейкоцитов. Исходя из имеющихся в литературе данных, можно предположить, что такими факторами являются провоспалительные цитокины (в частности, фактор некроза опухолей), играющие важную патогенетическую роль при развитии хронической РТПХ в условиях данной модели [5, 6].

В то же время введение мышам DHEA-S приводит к тому, что через 2 нед показатели окислительного метаболизма нейтрофилов существенно отличаются у них от аналогичных показателей у мышей с РТПХ, которым гормон не вводили. Во-первых, показатель спонтанного НСТ-теста на фоне предварительного введения DHEA-S значимо ниже, нежели в группе животных без введения гормона. Во-вторых, в группе мышей, получавших гормон, существует достоверная разница между показателями спонтанного и стимулированного НСТ-тестов. Сходные различия, вызванные ранним введением гормона, обнаружены и через 4 нед после начала индукции РТПХ (см. рис. 3).

Введение MDP в периоде индукции РТПХ сопровождается противоположным эффектом. Средний уровень спонтанной продукции супероксидного радикала клетками мышей, которым вводили препарат, был несколько повышен через 2 нед эксперимента по сравнению с группой животных, которым препарат не вводили (см. рис. 4). Правда, значимость этого различия не достигала принятого

уровня достоверности, но незначительность выявленных различий между экспериментальными группами не может удивлять, поскольку, как видно из приведенных на рис. 4 данных, развитие РТПХ само по себе стимулирует возрастание этого показателя до величины, близкой к максимальным возможностям нейтрофилов. И, следовательно, трудно было бы ожидать на этом фоне дальнейшего существенного повышения величины спонтанного НСТ-теста.

Поскольку наблюдаемые изменения окислительного метаболизма нейтрофилов нельзя объяснить непосредственным действием вводимых препаратов (у интактных мышей в эти сроки, как было указано выше, их эффекты уже не обнаруживаются), мы должны сделать вывод, что их введение приводит в самом раннем периоде развития РТПХ (вероятно, даже в 1-е сутки после начала индукции) к таким изменениям состояния клеток иммунной системы, которые сохраняются в организме длительное время, вызывая обнаруженные нами различия в продукции клетками супероксидного радикала и воздействуя (см. рис. 1) на частоту развития различных патогенетических вариантов хронической РТПХ.

Разумно предположить, что основным механизмом описанных выше эффектов DHEA-S и MDP является оппозитное влияние этих веществ на процесс Th1/Th2-поляризации в ходе развивающейся хронической РТПХ. В пользу этой гипотезы свидетельствуют не только совпадение знаков влияния исследованных соединений на активность супероксидпродуцирующих ферментных систем клеток (у интактных мышей) и на Th1/Th2-переключение (у животных с РТПХ), но и данные литературы, указывающие на наличие закономерной связи между генерацией различных типов Т-хелперов и окислительно-восстановительным балансом клеток иммунной системы. Недавно было установлено, что непосредственное воздействие супероксидного радикала на Т-хелперы, выделенные из крови человека, сдвигает Th1/Th2-баланс в сторону преобладания хелперов 2-го типа и увеличивает продукцию IL-4, IL-5 и IL-13 [8]. По-видимому, определяющую роль в связи между уровнем продукции АКМ и направлением Th1/Th2-поляризации играет генерация супероксидного радикала макрофагами и другими типами фагоцитирующих клеток с мощной НАДФН-оксидазной системой. Так, было обнаружено, что продукция IL-12 макрофагами мыши прямо связана с окислительно-восстановительным состоянием этих клеток. "Редуктивные" макрофаги, характеризующиеся высоким внутриклеточным уровнем восстановленного глутатиона, продуцируют большие количества IL-12, в то время как снижение соотношения GSH/GSSG в "окислительных" макрофагах снижает уровень продукции этого цитокина и тем самым способствует дифференцировке Т-лимфоцитов в сторону Th2-клеток [9, 11]. Авторы делают вывод, что окислительный стресс, приводя к увеличению популяции "окислительных" макрофагов, может воздействовать на процессы Th1/Th2-поляризации.

С этими данными, полученными в экспериментах *in vitro*, хорошо согласуются наши результаты, полученные на модели патологического процесса,

естественно развивающегося в целостном организме. Учитывая длительность сохраняющихся изменений окислительного метаболизма при воздействии DHEA-S и MDP, можно считать, что эти сдвиги в продукции супероксидного радикала клетками-фагоцитами могут и на более поздних этапах после развития РТПХ поддерживать условия, способствующие преимущественному протеканию Th1- или Th2-зависимых реакций соответственно.

Особый интерес вызывает обнаруженная нами способность DHEA-S инициировать длительное подавление продукции АКМ в условиях иммунопатологического состояния *in vivo*, если учесть, что этот гормон, продукция которого снижается с возрастом, способен противодействовать процессам инволюции иммунной системы и — при введении пожилым людям — восстанавливать активность Th1-зависимого звена иммунитета [7]. Аналогичный эффект влияния окислительно-восстановительного статуса клеток на изменения Th1/Th2-баланса при старении описан группой исследователей, чья другая работа уже цитировалась выше. Ими было показано, что трансгенные мыши, клетки которых содержат повышенные количества тиоредоксина и у которых вследствие этого макрофаги находятся в "редуктивном" состоянии, обладают увеличенной продолжительностью жизни. Это связывается с замедлением фазы перехода к преобладанию Т-хелперов 2-го типа, который наступает у мышей дикого типа в возрасте 8 мес, в то время как трансгенные животные поддерживают "редуктивное" состояние своих макрофагов и высокий уровень активности Th1-лимфоцитов на протяжении двух лет жизни [12].

Полученные данные свидетельствуют о наличии закономерной взаимосвязи между активностью кислородного метаболизма клеток иммунной системы и направлением девиации иммунного ответа в процессе развития Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояний. Разумно предположить, что основной точкой воздействия про- и антиоксидантов (в частности, исследованных нами DHEA-S и MDP) являются макрофаги, обладающие активными АКМ-продуцирующими системами и оказывающие существенное влияние на дифференцировку Т-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вольский Н. Н., Кудашева О. Т., Перминова О. М. и др. // Иммунология. — 2007. — № 3. — С. 134—137.
2. Козлов В. А., Кудашева О. Т., Колесникова О. П. и др. // Иммунология. — 2002. — № 3. — С. 143—146.
3. Кудашева О. Т., Гойман Е. В., Лыков А. П. и др. // Бюл. экпер. биол. — 2005. — № 9. — С. 325—327.
4. Ткачев В. О., Ненашева Е. В., Гойман Е. В. и др. // Иммунология. — 2006. — № 2. — С. 98—101.
5. Brown G. R., Thiele D. L. // J. Clin. Immunol. — 2000. — Vol. 20, N 5. — P. 379—388.
6. Brown G. R., Lee E. L., Thiele D. L. // J. Immunol. — 2003. — Vol. 170, N 10. — P. 5082—5088.
7. Khorram O., Vu L., Yen S. S. // J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci. — 1997. — Vol. 52, N 1. — P. 1—7.
8. King M. R., Ismail A. S., Davis L. S., Karp D. R. // J. Immunol. — 2006. — Vol. 176, N 5. — P. 2765—2772.
9. Mills C., Kincaid K., Alt J. M. et al. // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164, N 12. — P. 6166—6173.
10. Mohan P. F., Jacobson M. S. // Am. J. Med. Sci. — 1993. — Vol. 306, N 1. — P. 10—15.
11. Murata Y., Shimamura T., Hamuro J. // Int. Immunol. — 2002. — Vol. 14, N 2. — P. 201—212.
12. Murata Y., Amao M., Yoneda J., Hamuro J. // Mol. Immunol. — 2002. — Vol. 38, N 10. — P. 747—757.