

Е.В. Гойман, В.О. Ткачев, О.Т. Кудяева, О.П. Колесникова, В.А. Козлов

ЛИМФОПЕНИЯ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОГО ПРОЦЕССА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА У МЫШЕЙ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Трансплантация сингенных спленоцитов интактным мышам приводит к развитию лимфопении вследствие снижения пролиферативной активности гемопоэтических клеток-предшественников костного мозга. У мышей с хронической реакцией трансплантат против хозяина (хРТПХ) введение сингенных лимфоцитов значимо не влияет на уровень уже существующей лимфопении, но увеличивает ее продолжительность. Это хорошо согласуется с полученными данными о том, что перенос сингенных клеток увеличивает частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита при хРТПХ. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют в пользу патогенетического значения лимфопении и инициируемого ею процесса гомеостатической пролиферации в развитии аутоиммунных реакций при хРТПХ.

Ключевые слова: лимфопения, хроническая реакция трансплантат против хозяина, гомеостатическая пролиферация, аутоиммунный гломерулонефрит

LYMPHOPENIA AS A FACTOR INVOLVED IN THE AUTOIMMUNITY DEVELOPMENT IN MURINE GRAFT VS. HOST DISEASE

Е.В. Goiman, V.O. Tkachev, O.T. Kudayeva, O.P. Kolesnikova, V.A. Kozlov

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Syngeneic splenocyte transplantation leads to lymphopenia development in intact mice owing to decreased proliferative activity of bone marrow hematopoietic progenitor cells. In the mice with induced chronic graft-versus-host disease (cGVHD) transfer of syngeneic lymphocytes has little or no effect on the level of already existing lymphopenia, but increases its duration. These results are in close agreement with the received evidences that transfer of syngeneic cells increases frequency of autoimmune glomerulonephritis at cGVHD. Thus, results of research speak in favor of conclusion that lymphopenia and initiated by it homeostatic proliferation play a pathogenetic role in the development of autoimmune reactions at cGVHD.

Key words: lymphopenia, chronic graft versus host disease, homeostatic proliferation, autoimmune glomerulonephritis

В организме объемы периферических В- и Т-клеточного пулов поддерживаются на относительно постоянном уровне благодаря механизмам регуляции жизнеспособности, пролиферативной активности и апоптоза как гемопоэтических клеток-предшественников в костном мозге так и зрелых наивных лимфоцитов в кровотоке и вторичных лимфоидных органах. Показано, что лимфопения запускает клеточную пролиферацию зрелых лимфоцитов на периферии — процесс известен как гомеостатическая пролиферация. Предполагается, что гомеостатическая пролиферация приводит к снижению разнообразия распознающих антигены рецепторов Т-лимфоцитов. К настоящему времени во множестве экспериментальных работ были получены данные о связи лимфопении и последующего запуска процесса компенсаторной гомеостатической пролиферации с развитием аутоиммунной патологии за счет увеличения количества аутореактивных клеток [4, 9, 11].

В качестве модели исследования нами была выбрана хроническая реакция трансплантат против хозяина (хРТПХ), индуцированная переносом лимфоидных клеток от мышей родительской линии DBA/2 гибридам первого поколения (C57Bl6х-DBA/2)F1, которая спонтанно развивается по двум иммунопатологическим вариантам. Первый из них

(Th1-зависимый) характеризуется Т-клеточным иммунодефицитом, а клинической манифестацией второго (Th2-зависимого) является массивная протеинурия вследствие формирования аутоиммунного *lupus*-подобного гломерулонефрита [3]. Предполагается, что выбор пути развития в данной модели определяется преимущественной активацией Th1- либо Th2-звена иммунной системы в первые две недели после начала индукции хронической РТПХ [3, 5]. С другой стороны, механизм аутоиммунного поражения внутренних органов у *lupus*-реципиентов имеет много общего с патогенезом системной красной волчанки, в котором важное значение имеет неконтролируемая пролиферация аутоагрессивных клонов В- и Т-клеток в результате срыва толерантности к антигенам собственных тканей [7, 13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов первого поколения (C57Bl6х-DBA/2)F1, возрастом 2 месяца, полученных из лаборатории экспериментальных животных (моделей) НИИКИ СО РАМН (Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Хроническую РТПХ индуцировали внутривенным переносом 65×10^6 лимфоидных клеток мышей DBA/2 реципиентам — гибридам (C57Bl6xDBA/2) F1 двукратно с интервалом 6 дней [10]. Сингенные клетки вводили интактным мышам (C57Bl6xDBA/2) F1 по аналогичной схеме в той же суммарной дозе, либо в разовой дозе 40×10^6 клеток мышам с индуцированной хРТПХ трехкратно с интервалом 6 суток начиная с восьмых суток после второй трансплантации полуаллогенных лимфоцитов.

О развитии аутоиммунного гломерулонефрита судили по появлению стойкой протеинурии (более 3,5 мг/мл белка в трех последовательных измерениях). Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie, Австрия) при $\lambda = 570$ нм.

Пролиферативную активность клеток-предшественников костного мозга (долю клеток в S-фазе) оценивали по ингибированию образования экзогенных колоний в метил-целлюлозной культуре цитозин-арабинозидом [1]. Для этого клетки костного мозга выделяли из канала бедренной кости и культивировали в 0,9% метилцеллюлозной культуре «MethoCult M3430» («StemCell Technologies», Канада) с добавлением эритропоэтина «Recormon» («Boehringer Mannheim», Германия) в конечной концентрации 20 ЕД/мл в 96-луночных планшетах («Corning», США). Часть клеточной суспензии предварительно инкубировали с цитозин-арабинозидом (AraC; «Sigma», США) в конечной концентрации 1 мг/мл в течение 1 часа с последующей отмывкой от цитостатика. Пролиферативную активность клеток-предшественников костного мозга вычисляли по формуле:

$$(N_{\text{Total}} - N_{\text{AraC}}) / N_{\text{Total}}$$

где N_{Total} — общее количество экзогенных колоний в опыте без добавления цитостатика, а N_{AraC} — количество колоний в опыте с добавлением AraC.

Количество клеток селезенки, периферической крови и лейкоцитарную формулу определяли стандартными методами.

Статистическую обработку результатов проводили, используя непараметрический U-критерий Манна — Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было установлено, что Th2-зависимый вариант хронической РТПХ характеризуется ранним появлением в крови антител к нативной ДНК и формированием в дальнейшем иммунокомплексного аутоиммунного *lupus*-подобного гломерулонефрита, частоту развития которого можно оценивать по содержанию белка в моче, поскольку стойкая протеинурия у таких мышей тесно коррелирует с морфологическими признаками иммунного поражения ткани почечных клубочков [3]. Трансплантация сингенных лимфоидных клеток в тех же условиях не приводит к образованию антител к ДНК и появлению признаков аутоиммунной патологии [6]. Индукция хронической РТПХ приводит к развитию лимфо-

пени в ранние сроки после трансплантации полуаллогенных лимфоцитов (первые 2 недели), с последующим периодом «овершута», когда количество лейкоцитов в периферической крови превосходит аналогичные показатели интактных животных (рис. 1). Нормализация количества лимфоцитов в периферической крови, происходящая ко второму месяцу наблюдения, не означает восстановления субпопуляционного состава лимфоцитов. Так, установлено, что у *lupus*-реципиентов увеличивается абсолютное и относительное содержание $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток с фенотипом клеток памяти [2]. Этот факт, а также выявление у *lupus*-реципиентов высоких концентраций IL-7 в периферической крови (0,1 пг/мл и 6,5 пг/мл, $p < 0,05$, соответственно у контрольных животных и *lupus*-реципиентов) позволяет предположить участие гомеостатической пролиферации в возникновении аутоиммунной патологии в данной модели [2]. При этом, возможно, существенный вклад вносит индуцированная лимфопенией пролиферация В-лимфоцитов — процесс, остающийся к настоящему времени относительно слабоизученным [14].

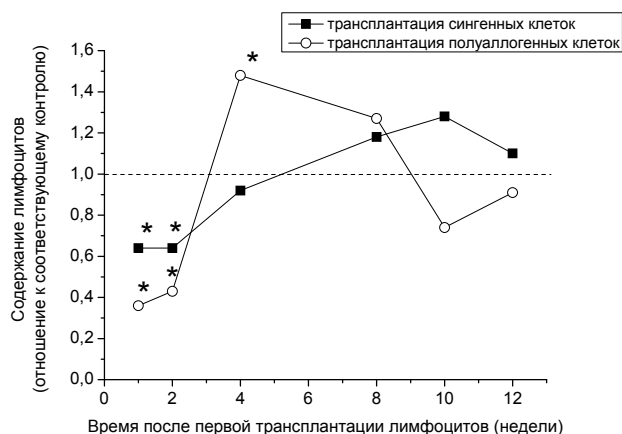


Рис. 1. Содержание лимфоцитов в периферической крови у мышей после трансплантации сингенных и полуаллогенных клеток. Данные представлены относительно значений контроля, принятых за 1. * — различия между опытной и контрольной группами достоверны, $p < 0,05$.

Существует предположение, что трансплантация сингенных лимфоцитов в ситуации их выраженного снижения, восполняя лимфоцитарный пул в организме, обрывает процесс гомеостатической пролиферации и тем самым не допускает срыва толерантности и развития аутоиммунного расстройства. Так, в работе E. Jang с соавторами на модели спонтанно развивающегося аутоиммунного артрита у мышей трансгенной линии K / B x N, характеризующейся лимфопенией на доклинической стадии, было показано, что трансплантация $CD4^+$ Т-лимфоцитов (в дозе 20×10^6 клеток), клеток лимфатических узлов и селезенки (40×10^6 клеток), или клеточной популяции, обогащенной $CD25^+$ Т-лимфоцитами (40×10^6 клеток) приводит к снижению частоты и тяжести развития поражения суставов [8]. На основании результатов

данной работы и сделанного предположения о важной патогенетической роли гомеостатической пролиферации в развитии аутоиммунного процесса у *lupus*-реципиентов для предупреждения формирования аутоиммунного гломерулонефрита мышам после индукции хронической РТПХ дополнительно вводили сингенные спленоциты еженедельно трехкратно в дозе 40×10^6 . Однако такой сингенный перенос привёл к неожиданному результату — частота развития *lupus*-нефрита возросла с 54 до 75 %.

Для выяснения возможных причин такого эффекта изучали влияние введения сингенных спленоцитов интактным животным на содержание клеток периферической крови. Оказалось, что у реципиентов сингенных лимфоцитов также развивается лимфопения, сохраняющаяся в течение двух недель после трансплантации (рис. 1). При этом количество клеток в костном мозге и селезенке оставалось на уровне, характерном для интактных животных (данные на рисунках не приведены), но пролиферативная активность гемопоэтических клеток-предшественников существенно снижалась (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемая лимфопения не связана с перераспределением клеток в организме, а объясняется снижением пролиферативной активности костномозговых клеток-предшественников.

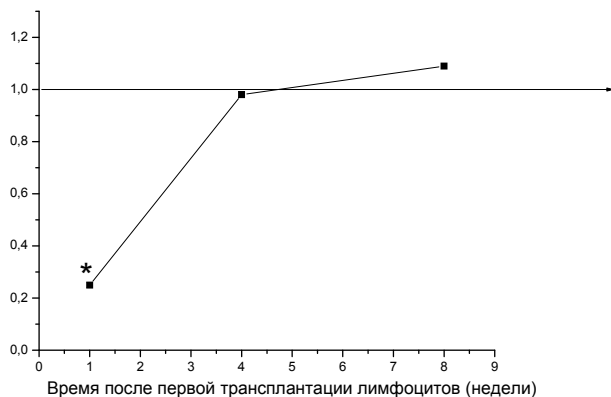


Рис. 2. Проллиферативная активность клеток костного мозга у мышей после трансплантации сингенных клеток. Данные представлены относительно значений контроля, принятых за 1. * — различия между опытной и контрольной группами достоверны, контрольная группа — $n = 20$; в группе с сингенным переносом каждая точка представлена средними значениями $n = 4$, $p < 0,05$.

Что касается лимфопении, возникающей в ранние сроки развития хРТПХ, то поскольку нами не было отмечено увеличение пролиферативной активности клеток костного мозга в сроки, соответствующие восстановлению клеточного состава периферической крови [6], можно предположить, что в поддержании количества лимфоцитов значительную роль в исследуемой системе играет процесс гомеостатической пролиферации.

Введение сингенных спленоцитов животным с развивающейся хРТПХ (после второго введения полуаллогенных клеток) не нормализует содержания лимфоцитов в периферической крови, и лимфопения у таких животных не только остается на уровне, характерном для этих сроков развития хРТПХ, но и сохраняется на более продолжительный срок (табл. 1). Таким образом, сингенный перенос лимфоцитов создает условия для усиления процесса гомеостатической пролиферации, что, вероятно, может служить объяснением повышенной частоты аутоиммунных реакций в этом случае.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что введение сингенных спленоцитов на ранних стадиях хРТПХ не нормализует лимфопению, но вызывает изменения кроветворения, способствующие ее поддержанию и, таким образом, может усугублять и/или пролонгировать лимфопению и усиливать гомеостатическую пролиферацию и связанную с этим экспансию аутоагрессивных клонов лимфоцитов, что и обуславливает увеличение частоты развития аутоиммунного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры тканей в гематологии. — Томск, 1992. — 272 с.
2. Гойман Е.В., Кудяева О.Т., Ильина Н.А., Борисов В.И. и др. Процессы гомеостатической пролиферации в патогенезе аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного хронической реакцией «трансплантат против хозяина» // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2010. — Т. 148, № 1. — С. 60–64.

Таблица 1
Содержание лейкоцитов в периферической крови у реципиентов с хронической РТПХ при введении сингенных спленоцитов, (M, min–max)

Группы	Количество лейкоцитов $n \times 10^6/\text{мл}$			
	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.
контроль ($n = 5$)	15,6 14,5–15,5	11,0 8,5–13,7	12,0 9,5–16,0	13,5 9,7–18,0
хРТПХ ($n = 5$)	10,8* 9,0–11,5	4,0** 2,7–5,0	8,4** 7,0–10,0	9,3** 7,5–11,7
хРТПХ + сингенный перенос ($n = 5$)	—	7,1* 6,7–7,5	5,8* 5,0–7,0	6,3* 5,0–8,5

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контролем; ** — достоверные различия между группами хРТПХ и хРТПХ + сингенный перенос.

3. Козлов В.А., Кудяева О.Т., Колесникова О.П., Сафронова И.В. и др. Th1- и Th2-зависимые варианты хронической реакции трансплантат против хозяина // Иммунология. — 2002. — Т. 23, № 3. — С. 143–146.

4. Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация лимфоцитов в аспекте иммунопатогенеза различных заболеваний // Иммунология. — 2006. — Т. 27, № 6. — С. 378–382.

5. Кудяева О.Т., Гойман Е.В., Лыков А.П., Колесникова О.П. и др. Влияние препаратов, изменяющих соотношение Th1/Th2, на частоту развития клинических вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2005. — Т. 140, № 9. — С. 325–327.

6. Ткачев В.О., Гойман Е.В., Лыков А.П., Кудяева О.Т. и др. Показатели гемопоэза в динамике развития хронической реакции трансплантат против хозяина // Иммунология. — 2006. — № 3. — С. 168–170.

7. Foster M.H. T cells and B cells in lupus nephritis // Semin. Nephrol. — 2007. — Vol. 27, N 1. — P. 47–58.

8. Jang E., Kim H.R., Cho S.H., Paik D.J. et al. Prevention of spontaneous arthritis by inhibiting

homeostatic expansion of autoreactive CD4 T-cell in the K/BxN model // Arthritis Rheum. — 2006. — Vol. 54. — P. 492–498.

9. Khoruts A., Fraser J.M. A causal link between lymphopenia and autoimmunity // Immunol. Lett. — 2005. — Vol. 98. — P. 23–31.

10. Kimura K., Ida., Shimada K., Kanai Y. Specificity of anti-nuclear antibodies induced in F1 mice undergoing the graft versus host reaction: isotypes and cross-reactivities // Clin. Exp. Immunol. — 1987. — Vol. 69. — P. 385–393.

11. Krupica T. Jr., Fry T.J., Mackall C.L. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model // Clin. Immunol. — 2006. — Vol. 120. — P. 121–128.

12. Min B., Yamane H., Hu-Li J., Paul W.E. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T-cell are regulated by different mechanisms // J. Immunol. — 2005. — Vol. 174. — P. 6039–6044.

13. Shlomchik M.J., Madaio M.P. The role of antibodies and B cells in the pathogenesis of lupus nephritis // Springer Semin. Immunopathol. — 2003. — Vol. 24. — P. 363–375.

14. Woodland R.T., Schmidt M.R. Homeostatic proliferation of B-cell // Semin. Immunol. — 2005. — Vol. 17. — P. 209–217.

Сведения об авторах

Гойман Елена Владимировна — научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: +7-913-934-34-44; e-mail: L.Goiman@mail.ru)

Ткачев Виктор Олегович — научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат биологических наук

Кудяева Ольга Тимофеевна — ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор биологических наук

Колесникова Ольга Петровна — руководитель лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук

Козлов Владимир Александрович — директор ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН