

УДК 577.152.34

Изменение содержания иммунопротеасом и макрофагов в печени крыс при индукции донорспецифической толерантности

Я. Д. Карпова¹, В. Д. Устиченко², Н. М. Алабедадькарим², А. А. Степанова¹, Ю. В. Люпина¹, К. И. Богуславский², Г. А. Божок², Н. П. Шарова¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61016, Харьков, ул. Переяславская, 23

*E-mail: yasiik@gmail.com

Поступила в редакцию 27.08.2016

Принята к печати 02.06.2017

РЕФЕРАТ Индукция донорспецифической толерантности (ДСТ) путем введения клеток донора в порталную вену реципиента является одним из методов решения проблемы приживления трансплантатов. Однако механизм развития ДСТ не выяснен. В представленной работе методами Вестерн-блоттинга и проточной цитофлуориметрии впервые изучено изменение содержания иммунопротеасом и макрофагов в печени крыс на ранних сроках развития аллоспецифической порталной толерантности. На основании полученных данных можно заключить, что индукция ДСТ – активный процесс, состоящий из двух фаз, в ходе которых изменяется уровень иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 протеасом в мононуклеарных клетках печени, включая клетки Купфера, а также количество клеток Купфера. Первая фаза длится до 5 сут после начала индукции ДСТ, вторая – с 5 по 14 сут. В обеих фазах уровень субъединиц LMP2 и LMP7 возрастает как в общем пуле мононуклеарных клеток, так и в клетках Купфера, с максимумами на 1-е и 7-е сут. Кроме того, со сдвигом в несколько суток в обеих фазах увеличивается общее количество клеток Купфера. При этом изменения наиболее выражены во второй фазе. На 3-и сут содержание мононуклеарных клеток, экспрессирующих иммунопротеасомы, становится ниже, чем у контрольных нативных животных. Предполагается, что в этой временной точке образуется своеобразное «окно возможностей» для последующего заполнения пустующей ниши клетками разных субпопуляций. В зависимости от этого возможно развитие либо толерантности, либо отторжения. Полученные результаты ставят новые задачи поиска способов воздействия на клеточный состав печени и экспрессию иммунопротеасом на 3-и сут после начала индукции ДСТ для блокирования развития отторжения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иммунопротеасомы, донорспецифическая толерантность, печень, клетки Купфера, крысы, проточная цитофлуориметрия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГКГ – главный комплекс гистосовместимости; ДСТ – донорспецифическая толерантность; АПК – антигенпредставляющие клетки; LSEC – клетки эндотелия синусоидов; Ab – антитела; pAb – поликлональные антитела; mAb – моноклональные антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема приживления органов до сих пор остается одной из самых актуальных в трансплантологии. Трансплантация применяется на терминальных стадиях заболевания органа, когда иные методы лечения оказываются неэффективными. При аллогенной трансплантации активируется иммунный ответ, который приводит к отторжению. Современные протоколы иммуносупрессии не всегда способны предотвратить отторжение, поэтому необходим поиск

способов индукции толерантности к трансплантату в организме реципиента.

Критическая роль печени в развитии трансплантационной толерантности известна давно. Спонтанное приживление печеночного аллотрансплантата у реципиентов, отличающихся от доноров по главному комплексу гистосовместимости (ГКГ), выявлено у аутобредных свиней [1], инбредных линий мышей [2] и крыс [3]. Сочетанная трансплантация печени и других органов приводила к лучшей

приживляемости, чем использование одиночных аллографтов [4–6].

Еще один ключевой фактор, участвующий в индукции толерантности к трансплантату, – наличие в печени иммунокомпетентных клеток донорского происхождения. Это подтверждается исследованиями, в которых показано, что при элиминации из донорской печени «пассажирных» лейкоцитов не развивается толерантность к аллографту [7–9].

Метод индукции донорспецифической толерантности (ДСТ) основан на соблюдении этих двух условий. Он реализуется путем трансфузии донорских клеток (спленоцитов, лимфоцитов, клеток костного мозга) в печень через портальную вену. Использование этого метода приводит к значительному увеличению срока жизни аллотрансплантатов сердца [10], почек [11], кишечника [12], кожи [13], островков поджелудочной железы [14], трахеи [15] у экспериментальных моделей. Однако молекулярно-клеточные механизмы индукции и поддержания ДСТ остаются невыясненными, хотя многие исследователи подчеркивают значительный вклад макрофагов печени (клеток Купфера) [16, 17].

Возможными кандидатами на роль «менеджеров» иммунного ответа, способных направить его по пути принятия или отторжения аллографта, считаются множественные формы иммунопротеасом, содержащие протеолитически активные иммунные субъединицы LMP2, LMP10 и/или LMP7. Иммунопротеасомы участвуют в образовании антигенных эпитопов для молекул ГКГ, регуляции экспрессии костимуляторных молекул на антигенпредставляющих клетках (АПК) и дифференцировке субпопуляций Т-лимфоцитов [18–21].

Ранее мы обнаружили изменение соотношения субъединиц иммунопротеасом LMP2 и LMP7 в печени и аллографтах яичника и щитовидной железы при индукции ДСТ [22, 23]. Приживление аллографтов сопровождалось значительным увеличением количества моноклеарных клеток в печени, экспрессирующих иммунопротеасомы с субъединицей LMP2, на 30-е сут после индукции ДСТ.

Предыдущие экспериментальные и клинические исследования показали, что индукция ДСТ наступает не во всех случаях [24, 25]. Более того, у 7–15% реципиентов развивается сенсibilизация к донорским антигенам [26, 27]. Поскольку пока не известен конкретный механизм индукции ДСТ, заранее определить вектор иммунного ответа в сторону принятия трансплантата либо его отторжения не представляется возможным. Это снижает ценность данного метода и ограничивает его использование в клинической трансплантологии.

Очевидно, что иммунологические события, происходящие в печени реципиента сразу после введения донорских клеток и связанные с распознаванием и презентацией антигена, могут определять развитие толерантности. В связи с этим исследование каскада клеточно-опосредованных реакций и изменения пула протеасом на ранних сроках после введения донорского антигена представляется актуальным для понимания механизма индукции ДСТ.

Цель нашей работы состояла в определении уровня иммунопротеасом и количества резидентных макрофагов в печени крыс в первые 2 недели после начала индукции ДСТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы

В работе использованы среда ДМЕМ, коллагеназа и ДНКазы I (все Sigma, США), перколл (Pharmacia, Швеция), сапонин (Calbiochem, США), pAb кролика к субъединице LMP7, mAb мыши к субъединице LMP2 (все Biomol International, Великобритания), mAb мыши к макрофагам, конъюгированные с фикоэритрином (Anti-Rat Macrophage Marker, eBioscience, США), mAb мыши к β -актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела к IgG кролика, меченные Alexa 488 (Invitrogen, США), антитела к IgG мыши, конъюгированные с фикоэритрином (eBioscience, США).

Животные

Эксперименты были проведены на 5–6-месячных самках крыс линий Вистар и Август. Донорами были крысы линии Вистар, реципиентами – крысы линии Август. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых с экспериментальной и иной научной целью» (Страсбург, 1985). В экспериментах использовали следующие группы животных: группа 1 ($n = 12$) – интактный контроль; группа 2 ($n = 48$) – ложнопериоперированные животные (интрапортальное введение физиологического раствора); группа 3 ($n = 48$) – животные с индукцией ДСТ (интрапортальное введение спленоцитов); группа 4 ($n = 30$) – животные со «срывом» ДСТ (внутрибрюшинная инъекция хлорида гадолиния $GdCl_3$ (1 мг/100 г массы тела) и интрапортальное введение спленоцитов через 1 сут).

Получение спленоцитов и индукция ДСТ

Все процедуры проводили в стерильных условиях. Спленоциты получали из селезенки крыс линии Вистар по стандартному протоколу [28]. От эритроцитов избавлялись путем трехкратной обработ-

ки клеточной суспензии раствором, содержащим 154 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната натрия, 0.082 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA). Полученные клетки отмывали 2 раза средой ДМЕМ. Жизнеспособность спленоцитов, которую проверяли методом окрашивания трипановым синим, составляла в среднем 90%. ДСТ индуцировали путем введения в портальную вену печени 1 мл стерильного физиологического раствора, содержащего 1×10^7 спленоцитов. Исследование печени проводили на 1, 3, 5, 7, 10, 14-е сут после индукции.

Получение мононуклеарных клеток печени

Печень крыс перфузировали через воротную вену бескальциевым буфером (5 мМ EDTA на 0.1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) в течение 5 мин. Затем печень выделяли и перфузировали 0.1 М фосфатно-солевым буфером, содержащим 0.4 мг/мл коллагеназы, 3.7 М CaCl₂, 25 нг/мл ДНКазы I, 5 мМ MgCl₂ (pH 7.4), при 37°C в течение 10 мин. После этого ткань измельчали ножницами и дополнительно инкубировали в буфере с коллагеназой при 37°C в течение 30 мин, дезинтегрировали путем пипетирования, фильтровали через нейлоновое сито и центрифугировали при 20 g и 4°C в течение 2 мин. Отбирали супернатант и центрифугировали его при 400 g в течение 3 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 30% перколле и центрифугировали при 400 g в течение 30 мин при 4°C. Отбирали клетки с границы раздела и отмывали 2 раза в 0.1 М фосфатно-солевом буфере при 4°C.

Фенотипический анализ клеток методом проточной цитофлуориметрии

Для идентификации субъединиц иммунопротеасом выделенные мононуклеарные клетки печени фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 15 мин, пермеабилizировали в течение 15 мин в 1% растворе сапонина, приготовленном на 0.1 М фосфатно-солевом буфере. Обработку rAb кролика к субъединице LMP7 и mAb мыши к субъединице LMP2 проводили в течение ночи при 4°C в пробе, содержащей 1×10^6 клеток и соответствующие антитела (разведение 1 : 600 на 0.1 М фосфатно-солевом буфере с 1% бычьего сывороточного альбумина). После отмывки клетки инкубировали с вторичными антителами: к IgG кролика, мечеными Alexa 488, или антителами к IgG мыши, мечеными фикоэритрином, в разведении 1 : 500 в течение 30 мин при комнатной температуре.

Для идентификации клеток Купфера 1×10^6 клеток ресуспендировали в 0.25 мл фосфатно-солевого буфера, содержащего 10% фетальной телячьей сыворотки, и инкубировали в течение 30 мин с mAb мыши

Anti-Rat Macrophage Marker (разведение 1 : 50), конъюгированными с фикоэритрином.

Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Bioscience, США) с использованием программного обеспечения CellQuestPro.

Вестерн-блоттинг

Относительное содержание субъединиц протеасом и β-актина определяли в осветленных гомогенатах печени с использованием mAb мыши к субъединице LMP7, субъединице LMP2 и β-актину как описано ранее [23].

Статистический анализ проводили с помощью программного приложения Excel и Statistica 7.0. Данные представлены в виде медианы, значимость различий между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни с уровнем значимости 0.05. При множественных сравнениях использовали поправку Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 протеасом в клетках печени крыс после интрапортального введения спленоцитов

С помощью Вестерн-блоттинга в осветленных гомогенатах печени крыс с индукцией ДСТ (группа 3) был выявлен повышенный уровень иммунных субъединиц протеасом на 7-е сут после начала индукции ДСТ у пяти животных из шести в сравнении с ложнооперированным контролем (рис. 1). Очевидно, у одного животного механизмы развития ДСТ были нарушены. У ложнооперированных животных не выявлено различий в содержании иммунных субъединиц на всех исследованных сроках после введения физиологического раствора. Не обнаружено также различий в содержании иммунных субъединиц в печени у животных 4-й группы, которым вводили хлорид гадолиния. Чтобы понять, связаны ли обнаруженные изменения в пуле иммунопротеасом с мононуклеарными клетками печени, эти клетки изучали методом проточной цитофлуориметрии.

На рис. 2А представлены гистограммы, полученные при анализе окрашенных антителами к иммунным субъединицам LMP2 и LMP7 мононуклеарных клеток печени крыс. Выявлено изменение количества клеток, экспрессирующих субъединицы LMP2 и LMP7 после начала индукции ДСТ (рис. 2Б). Установлено, что уже на 1-е сут в печени животных обеих групп с интрапортальным введением спленоцитов (группы 3 и 4) количество LMP7-позитивных клеток увеличивается в 1.8 раза,

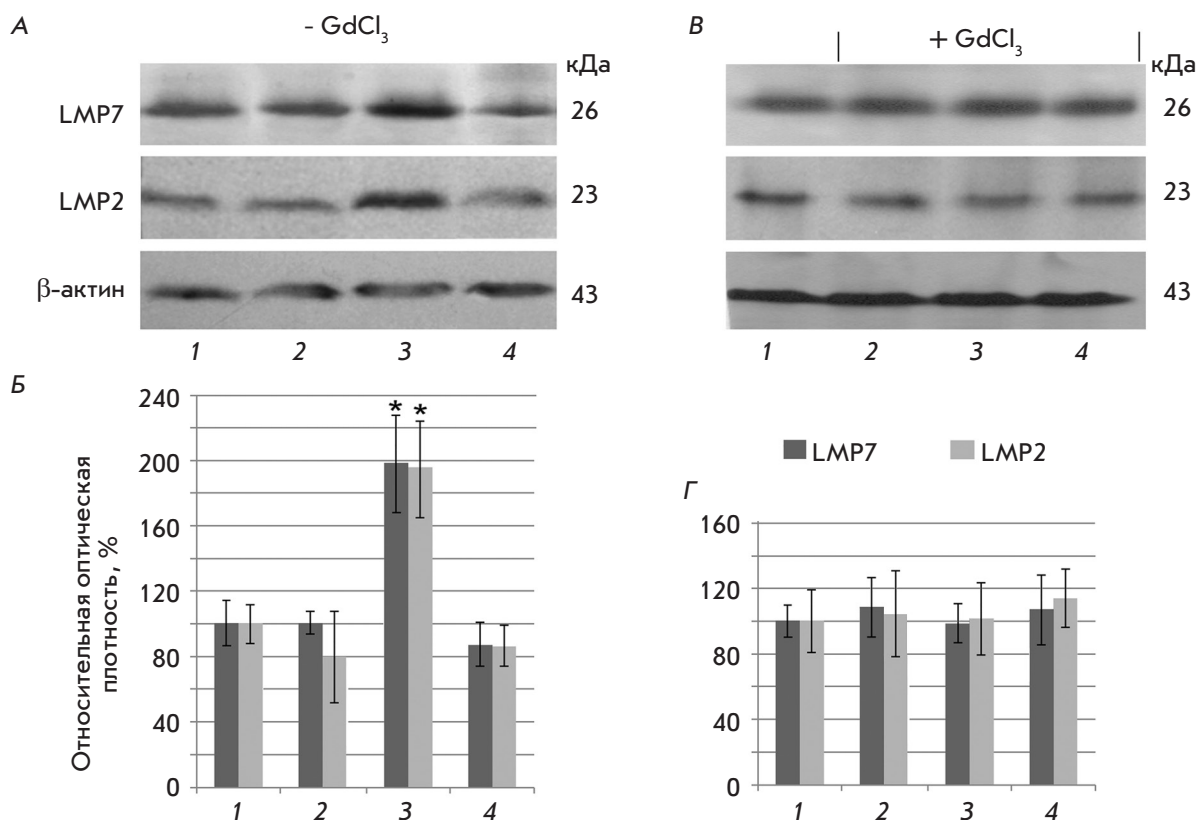


Рис. 1. Содержание субъединиц LMP7 и LMP2 протеасом в осветленных гомогенатах печени ложнооперированных крыс на 7-е сут после введения физиологического раствора (1) и печени крыс на 1 (2), 7 (3) и 14-е сут после начала индукции ДСТ (4) с предварительной инъекцией $GdCl_3$ и без нее. А, В – Вестерн-блоты субъединиц LMP7, LMP2 и β -актина. Б, Г – относительное количество (оптическая плотность блотов) субъединиц LMP7 и LMP2, нормализованное на содержание β -актина. За 100% принимали количество субъединиц в образцах ложнооперированных животных; приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего, обозначены значимые отличия при $p < 0.05$ и $n = 5-6$ по сравнению с ложнооперированным контролем (*)

а LMP2-позитивных – в 3 раза по сравнению с ложнооперированным контролем (группа 2).

Хлорид гадолиния широко применяется в качестве специфического ингибитора антигенпредставляющей функции клеток Купфера [29]. Как показано ранее, введение этого соединения экспериментальным животным за сутки до интрапортальной инфузии спленоцитов отменяет феномен индукции ДСТ [13, 16].

Нами установлено, что у обработанных $GdCl_3$ животных (группа 4) количество клеток, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7, не отличалось значимо на 1-е сут от количества клеток у животных группы 3 (без обработки), но повышено по сравнению с ложнооперированными (группа 2) (рис. 2Б).

Учитывая богатый состав АПК печени, к которым помимо клеток Купфера и клеток эндотелия синусоидов (LSEC) относятся дендритные и звездчатые клетки [30], логично было бы заключить, что увеличение числа клеток, экспрессирующих иммунные субъединицы LMP2 и LMP7, может происходить

и на фоне ингибирования функции макрофагов. Однако в этом случае количество клеток, содержащих LMP2 и LMP7, должно различаться в группах 3 и 4: в группе 4 таких клеток должно быть меньше, чем в группе 3. Отсутствие значимых различий свидетельствует о том, что увеличение количества клеток, экспрессирующих LMP2 и LMP7, на 1-е сут обусловлено главным образом притоком в печень донорских спленоцитов, содержащих иммунные протеасомы. Макрофаги, если они и вносят вклад в общее число обогащенных иммунопротеасомами мононуклеарных клеток печени в этот период, то он минимален и не влияет на полученный результат.

На 3-и сут количество мононуклеарных клеток, содержащих иммунопротеасомы, в печени животных группы 3 снижалось по сравнению с первыми сутками (рис. 3). Это могло быть следствием того, что спленоциты донора покинули печень реципиента, мигрируя к регионарным лимфоузлам [31]. Возможно также, что они были элиминированы в результате

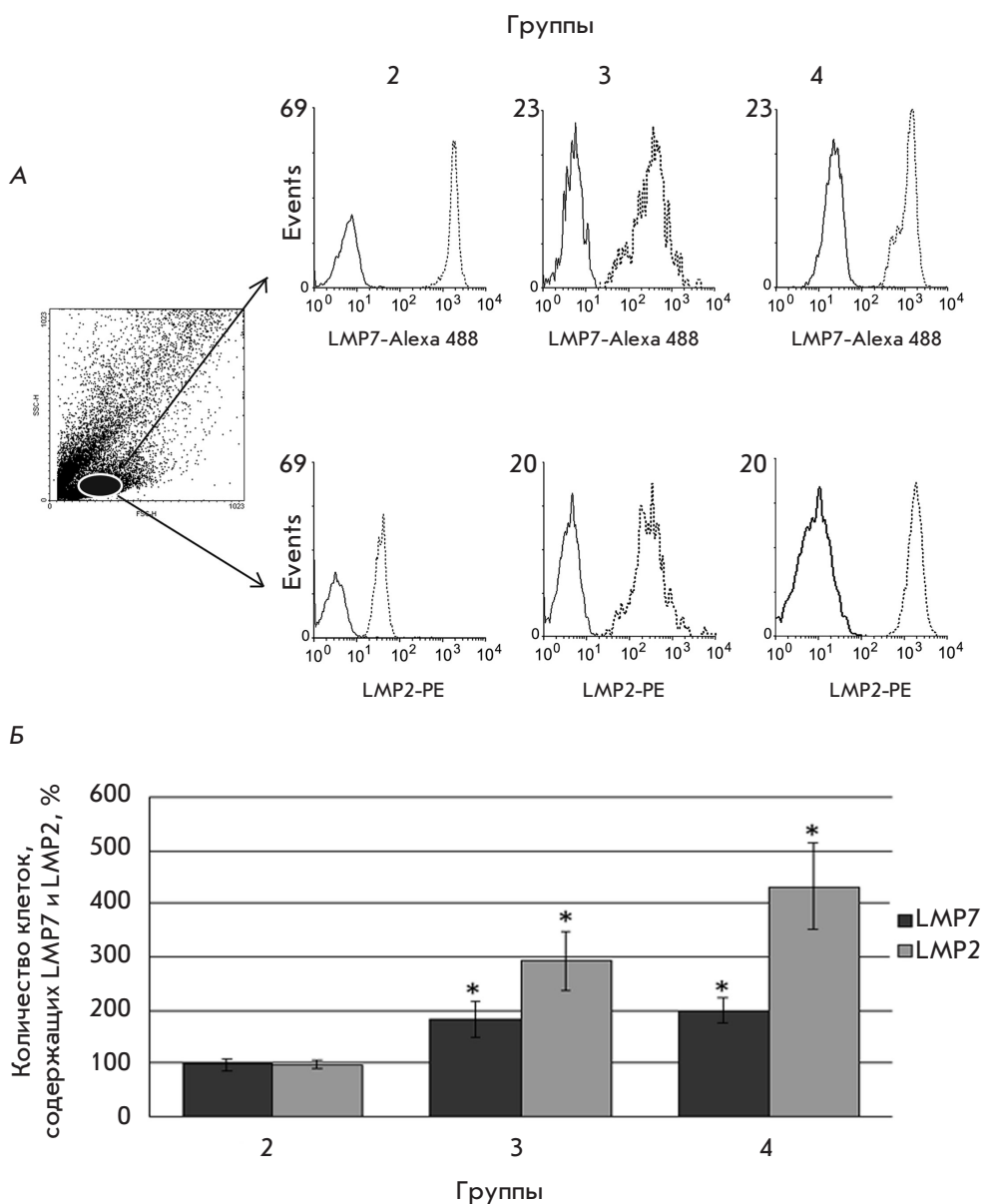


Рис. 2. Цитофлуориметрический анализ экспрессии субъединиц LMP7 и LMP2 в мононуклеарных клетках печени крыс. А – на точечном графике прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния овалом выделена субпопуляция анализируемых клеток. В правой части представлены гистограммы экспрессии LMP7 и LMP2 в анализируемой субпопуляции клеток печени крыс групп 2–4 на первые сутки после начала индукции ДСТ. Б – содержание (%) мононуклеарных клеток, экспрессирующих субъединицы LMP2 и LMP7, в печени животных групп 2–4 на 1-е сут. На гистограммах: сплошная линия – изотипический контроль, пунктирная линия – опыт. За 100% принимали количество клеток, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7, в образцах группы 1. Данные значимо отличаются от группы 2 при $p < 0.05$ и $n = 5$ (*)

активации цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов реципиента [32].

Интересен факт уменьшения количества мононуклеарных клеток, содержащих иммунные протеасомы, на 3-и сут не только в сравнении с первыми сутками после начала индукции ДСТ, но и относительно их базального уровня у контрольных животных группы 1. Если учесть, что иммунопротеасомы экспрессируются в основном в АПК и иммунокомпетентных клетках, то это косвенно указывает на уменьшение их количества в печени на 3-и сут после начала индукции. Это может быть связано с апоптозом активированных Т-лимфоцитов, наблюдаемым в печени при инициации и поддержании толерогенного статуса [31]. Однако независимо от того, какие механизмы

были задействованы, количество мононуклеарных клеток, обогащенных иммунопротеасомами, в печени в это время минимально, что может быть своеобразным «окном возможностей» для последующего заполнения пустующей ниши клетками разных субпопуляций, и в зависимости от этого развития аллоспецифической толерантности либо отторжения.

На 7-е сут после введения спленоцитов наблюдался максимальный подъем содержания мононуклеарных клеток, экспрессирующих иммунопротеасомы, в печени животных группы 3, который превышал показатели контрольной группы почти в 100 раз для LMP2 и в 200 – для LMP7 (рис. 3). Такой массивный ответ мог быть вызван, с одной стороны, притоком в печень иммунокомпетентных клеток в от-

вет на введение донорских спленоцитов, а с другой, активацией резидентного пула АПК в самой печени, которая сопровождается повышением содержания иммунных субъединиц [33, 34]. В последующие сутки количество клеток, экспрессирующих иммунные субъединицы, постепенно снижалось.

В целом, результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, совпадают с данными Вестерн-блоттинга, указывающими на всплеск экспрессии иммунопротеасом в печени на 7-е сут после индукции ДСТ. Кроме того, обнаружение этого эффекта не у всех животных подтверждает предположение о разных возможностях заполнения ниши после 3 сут, что критично для развития толерантности или отторжения.

У обработанных $GdCl_3$ животных не наблюдали такого выраженного увеличения уровня клеток, обогащенных иммунопротеасомами. Количество LMP7-позитивных клеток не отличалось от их количества у ложнооперированных животных, а число LMP2-позитивных клеток на 7-е сут превышало значения в контроле всего в 4 раза. Разница между группами 3 и 4 косвенно свидетельствует о том, что ингибирование клеток Купфера влияет на зависимые от иммунопротеасом процессы, происходящие на ранних этапах индукции ДСТ.

Взаимосвязь между содержанием клеток Купфера и изменением экспрессии иммунопротеасом при индукции ДСТ

Полученные результаты продиктовали необходимость прямого определения содержания клеток Купфера в разные сроки после введения спленоцитов. Использовали моноклональные антитела, распознающие ED2-подобные антигены на мембранах резидентных макрофагов крыс, в том числе клеток Купфера [35].

Профиль динамики ED2-позитивных клеток тоже имел два максимума (рис. 4), причем первый пик выявлялся на двое, а второй – на трое суток позже по сравнению с пиками содержания суммарного пула мононуклеарных клеток, экспрессирующих иммунопротеасомы (рис. 3 и 4). Такой сдвиг можно объяснить тем, что сначала АПК презентируют с участием иммунопротеасом чужеродный аллоантиген. Этот процесс сопровождается выбросом медиаторов иммунного ответа, которые служат сигналом для пролиферации клеток Купфера [36, 37].

У животных группы 4 всплесков количества макрофагов в печени не наблюдалось, вероятно, в связи с тем, что этап презентации антигена на фоне введения $GdCl_3$ отсутствовал или был дефектным.

Полученные результаты дают основание утверждать, что индукция порталной толерантности – это

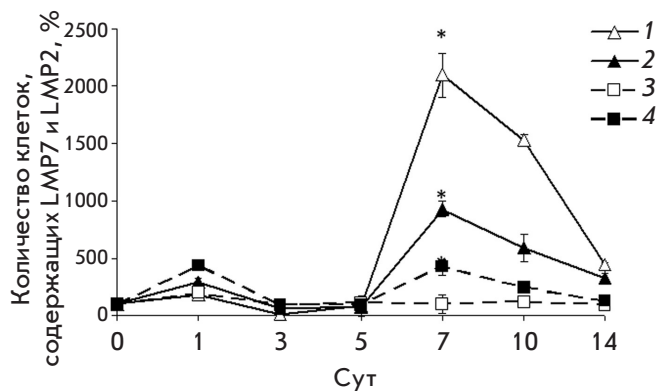


Рис. 3. Изменение количества мононуклеарных клеток, содержащих субъединицу LMP2 (закрашенные символы) и субъединицу LMP7 протеасом (открытые символы), через разные промежутки времени после начала индукции ДСТ в печени у животных групп 3 (кривые 1 и 2) и 4 (кривые 3 и 4). По оси абсцисс – сутки после начала индукции ДСТ. За 100% принимали количество клеток, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7, в образцах группы 1. Данные статистически значимо отличаются от базального уровня (группа 1), $p < 0.05$, $n = 5$ (*)

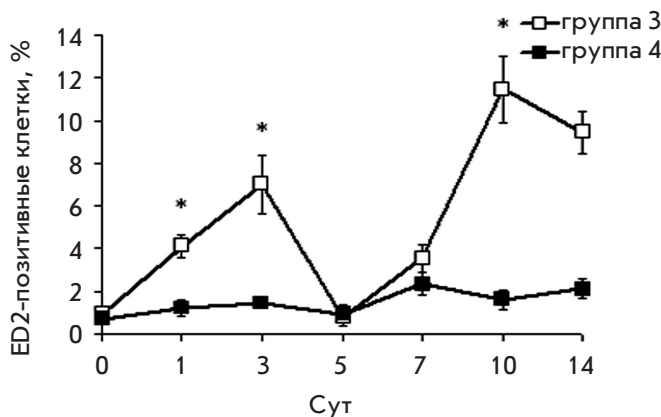


Рис. 4. Цитофлуориметрический анализ клеток, экспрессирующих маркер макрофагов ED, у животных групп 3 и 4 через разные промежутки времени после введения донорских спленоцитов. По оси абсцисс – сутки после начала индукции ДСТ. За 100% принимали количество клеток в образцах группы 1. Данные статистически значимо отличаются от базального уровня (группа 1), $p < 0.05$, $n = 5$ (*)

активный процесс, затрагивающий несколько субпопуляций АПК печени и вовлекающий перестройки внутриклеточного протеасомного пула в механизмы процессинга и презентации антигенов. При этом на ранних стадиях развития ДСТ наблюдаются две «волны»: первая (1–3 сут) связана с притоком донорских клеток иммунной системы в печень, вторая

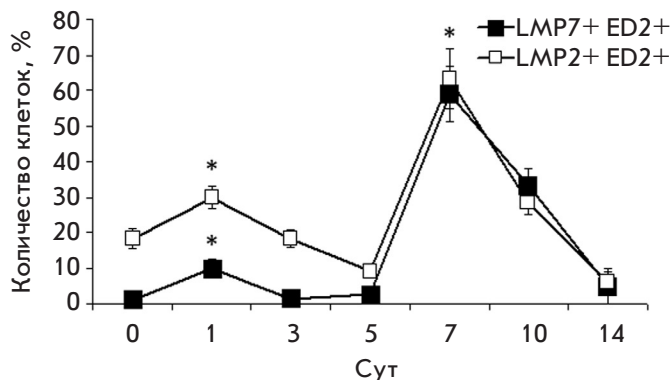


Рис. 5. Цитофлуориметрический анализ экспрессии субъединиц LMP7 и LMP2 в ED2-позитивных клетках печени животных группы 3 после начала индукции ДСТ. По оси абсцисс – сутки после начала индукции ДСТ; за 100% принимали общее количество ED2-позитивных клеток. Данные значимо отличаются от базального уровня (группа 1), $p < 0.05$, $n=5$ (*)

(7–10 сут) – с активацией ответа в печени реципиента, в котором задействованы и клетки Купфера.

Изменяется ли профиль экспрессии индуцибельных субъединиц LMP2 и LMP7 в клетках Купфера после интрапортального введения аллоантигена?

Для ответа на этот вопрос были изучены изменения, происходящие в протеасомном пуле ED2-позитивных клеток в печени животных с индукцией ДСТ (группа 3) в разные сроки после введения донорских спленоцитов (рис. 5). Во-первых, выявлены два пика повышения количества субъединиц LMP2 и LMP7 – на 1-е и 7-е сут. Во-вторых, обнаружено, что соотношение экспрессии субъединиц LMP2 и LMP7 в ED2-позитивных клетках меняется в зависимости от времени после индукции ДСТ. В первые 5 сут количество LMP2 возрастает более заметно, чем LMP7, на 7-е сут – уровень обеих иммунных субъединиц одинаково высок.

Во временных изменениях количества ED2-позитивных клеток и иммунопротеасом можно выделить две фазы. В первой фазе количество LMP2 и LMP7 увеличивается на 1-е сут так же, как и в общем пуле мононуклеарных клеток, а количество ED2-позитивных клеток возрастает на 3-и сут (рис. 3–5). Во второй фазе все происходит в той же последовательности: на 7-е сут приходится пик экспрессии иммунных субъединиц протеасом в ED2-позитивных клетках так же, как и в общем пуле мононуклеарных клеток, после этого на 10-е сут увеличивается количество ED2-позитивных клеток.

По-видимому, существуют различия в механизмах увеличения экспрессии иммунных субъединиц протеасом в общем пуле мононуклеарных клеток

в первой и второй фазах. Первый пик экспрессии субъединиц LMP2 и LMP7 отражает, в основном, приток спленоцитов донора, обогащенных иммунопротеасомами. В то же время второй пик в большей или меньшей мере может быть связан с синтезом *de novo* субъединиц LMP2 и LMP7 в мононуклеарных клетках печени реципиента, в том числе в клетках Купфера. Этот синтез индуцируется в первой фазе в результате встречи спленоцитов с АПК печени. Как известно, LSEC способны к кросс-презентации чужеродного антигена непосредственно CD8⁺ Т-лимфоцитам [38], причем для этого требуется незначительное количество стимулирующего биоматериала (< 1 нМ). Этот процесс осуществляется в течение нескольких часов [39] и сопровождается высвобождением цитокинов [40, 41], которые являются сигналом для повышения уровня индуцибельных субъединиц LMP7 и LMP2 [21, 42]. В пользу предположения о синтезе *de novo* иммунных субъединиц протеасом во второй фазе свидетельствует и тот факт, что их экспрессия под действием цитокинов достигает максимума только через 5–7 дней [43, 44]. Первый пик повышения уровня иммунных субъединиц в клетках Купфера может отражать начальный этап их синтеза *de novo*.

Соотношение иммунных субъединиц протеасом влияет на активацию макрофагов и поляризацию их в ED1- или ED2-фенотип [45]. Следовательно, изменение уровня субъединиц LMP2 и LMP7 в субпопуляции клеток может быть связано с активацией макрофагов типа 2. Это, в свою очередь, объясняет преобладание в печени процессов, препятствующих развитию отторжения, так как ED2-макрофаги относятся к противовоспалительному функциональному фенотипу, для которого характерна секреция цитокинов IL-10, IL-4, TGF- β [46].

Установленная нами динамика экспрессии иммунопротеасом мононуклеаров печени отражает изменения в реактивности их субпопуляций в ответ на введение чужеродных антигенов. Ранее были получены данные о появлении максимумов активированных клеток в печени после введения пептидного антигена или адоптивного переноса лимфоцитов. Например, после адоптивного переноса CD8⁺ Т-лимфоцитов в печени реципиента наблюдали пролиферацию донорских клеток на 2.5 и 6-е сут [47]. Обнаружено также 8-кратное увеличение субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов на 2-е сут после их интрапортального введения и постепенное уменьшение к 4 сут [48]. Стимуляция антигенным пептидом SEFLLEKRI приводила к 100-кратному приросту количества мононуклеарных клеток в печени, начиная с 2 сут, тогда как к 6 сут реакция угасала [49]. Интересно, что пик пролиферации лимфоцитов на-

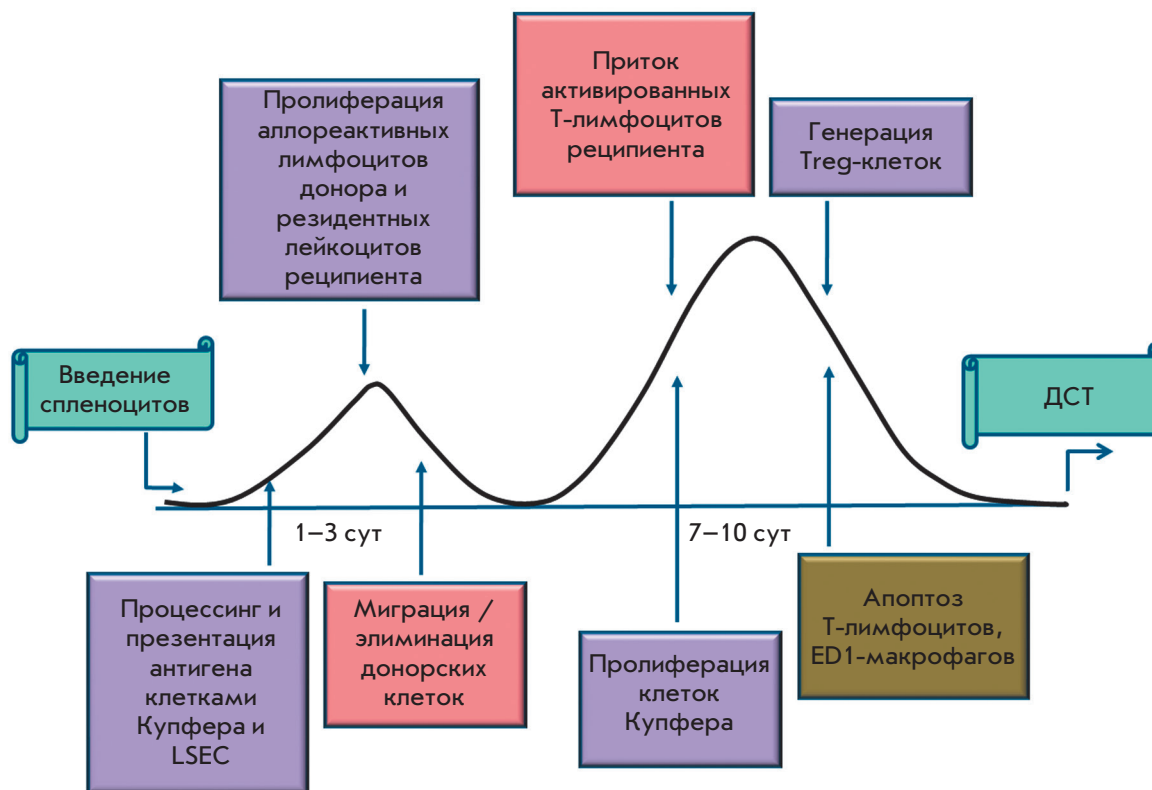


Рис. 6. Схема индукции и развития ДСТ

блюдался на 4-е сут, а динамика остальных субпопуляций носила двухфазный характер с максимумами на 1-е и 4-е сут.

Таким образом, двухфазный характер реактивности иммунитета печени в ответ на интрапортальное введение донорского антигена имеет под собой строгую иммунологическую основу (рис. 6). В первой фазе LSEC и клетки Купфера встречаются с донорскими клетками, которые, благодаря специфической способности печени к удерживанию активированных CD8⁺ Т-лимфоцитов [48], пребывают там достаточное время, необходимое для презентации антигена. После процессинга и презентации антигена, в которых участвуют иммунопротеасомы, запускается пролиферация донорских лейкоцитов и резидентных иммунокомпетентных клеток печени. Презентация антигена и активация лимфоцитов сопровождается выбросом цитокинов, которые играют ведущую роль в привлечении макрофагов и лимфоцитов реципиента в печень [50, 51]. Вследствие этого при индукции ДСТ появляется второй пик в динамике пула иммунопротеасом печени.

Взаимодействие активированных CD8⁺ Т-лимфоцитов с клетками Купфера приводит к их апоптозу за счет отсутствия адекватной провоспалительной

стимуляции [48]. Кроме прямого взаимодействия, клетки Купфера вырабатывают ряд проапоптотических веществ, таких, как TNF- α , CD95-лиганд, галектин-1, индоламин-диоксигеназа [52, 53]. В результате сокращения количества лимфоцитов в конце первой фазы индукции ДСТ уменьшается пул иммунопротеасом в печени. Дополнительное уменьшение количества иммунопротеасом в этот период может происходить за счет миграции донорских клеток в кровотоки реципиента.

Способность иммунокомпетентных субпопуляций клеток печени к первичной презентации антигена [51], в результате которой аллореактивные CD8⁺ Т-лимфоциты элиминируются посредством апоптоза, не получив положенную костимуляцию [48], дает возможность избежать развития иммунного ответа в первые сутки (1–3) после введения донорских клеток.

Вторая фаза связана с клональной экспансией и притоком в печень активированных Т-лимфоцитов и макрофагов реципиента. Фенотипический профиль клеток, заполняющих иммунологическую нишу печени в этой фазе, вероятно, определяет развитие либо толерантности, либо отторжения. Активация защитных механизмов иммунитета пе-

чени, направленных на устранение/уменьшение воспаления, может сместить баланс в сторону толерантности. Эти механизмы включают апоптоз активированных Т-лимфоцитов реципиента [31], ED1-поляризованных макрофагов и активированных Т-клеток в присутствии макрофагов ED2-фенотипа в печени [54, 55] и экспансию Treg-клеток [56] в ответ на презентацию антигена в печени.

Репертуар иммунных субъединиц влияет на иерархию презентируемых антигенных эпитопов АПК. Описаны, по крайней мере, четыре формы иммунных протеасом. Одна форма содержит все три протеолитические иммунные субъединицы – LMP7, LMP2 и LMP10. Две формы содержат по две иммунные субъединицы и одну протеолитическую конститутивную субъединицу: $\beta 5$ -LMP2-LMP10 и LMP7-LMP2- $\beta 2$. Одна форма содержит иммунную субъединицу LMP7 и две конститутивные субъединицы $\beta 1$ и $\beta 2$ [57–60]. В зависимости от сочетания протеолитически активных субъединиц меняются конформация субстратсвязывающих карманов [61], предпочтительные сайты гидролиза белков и, следовательно, набор продуцируемых антигенных эпитопов. Поэтому изменение баланса иммунных субъединиц в резидентных и транзиторных субпопуляциях клеток иммунной системы играет важную роль в том, каким образом будет представлен чужеродный антиген, вызовет он отторжение или будет «принят за своего».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе впервые изучены изменения, происходящие в пуле иммунопротеасом мононуклеарных клеток печени при индукции аллоспецифической портальной толерантности. На основании полученных данных можно заключить, что индукция ДСТ – это активный процесс, имеющий две фазы, в ходе которых изменяется соотношение иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 протеасом и количество АПК печени, в том числе клеток Купфера. Очевидно, баланс этих показателей важен для развития толерантности к трансплантируемым тканям. Третьи сутки после начала индукции ДСТ являются ключевой точкой, в которой образуется своеобразное «окно возможностей» для последующего заполнения пустующей ниши клетками разных субпопуляций, и в зависимости от этого развития толерантности либо отторжения. Полученные результаты ставят новые задачи поиска способов воздействия на клеточный состав печени и экспрессию иммунных протеасом на 3-и сут после начала индукции ДСТ для блокирования развития отторжения. ●

Работа частично выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант для молодых ученых 16-34-60083-мол_а_дк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Calne R.Y., Sells R.A., Pena J.R., Davis D.R., Millard P.R., Herbertson B.M., Binns R.M., Davies D.A. // Nature. 1969. V. 2. № 223 (5205). P. 472–476.
2. Qian S., Demetris A., Murase N., Rao A.S., Fung J.J., Starzi T.E. // Hepatology. 1994. V. 19. P. 916–924.
3. Zimmermann F.A., Davies H.S., Knoll P.P. // Transplantation. 1984. V. 37. P. 406–410.
4. Kamada N., Wight D.G.D. // Transplantation. 1984. V. 38. № 3. P. 217–221.
5. Cunningham E.C., Sharland A.F., Bishop G.A. // Clin. Dev. Immunol. 2013. 2013:419692. Epub 2013 Nov 6.
6. Topilsky Y., Raichlin E., Hasin T., Boilson B.A., Schriger J.A., Pereira N.L., Edwards B.C., Schriger J.A., Pereira N.L., Edwards B.S., Topilsky Y., Raichlin E., Hasin T. // Transplantation. 2013. V. 95. P. 859–865.
7. Sun J., McCaughan G.W., Gallagher N.D., Scheil A.G., Bishop G.A. // Transplantation. 1995. V. 60. P. 233–236.
8. Shimizu Y., Goto S., Lord R., Vari F., Edwards-Smith C., Chiba S., Schlect D., Buckley M., Kusano M., Kamada N. // Transpl. Int. 1996. V. 9. P. 593–595.
9. Ko S., Deiwick A., Jager M.D., Dinkel A., Rohde F., Fisher R.T., Tsui T.Y., Rittmann K.L., Wonigeit K., Schlitt H.J. // Nat. Med. 1999. V. 5. P. 1292–1297.
10. Kenick S., Lowry R.P., Forbes R.D.S., Lisbona R. // Transplant. Proc. 1987. V. 19. P. 478–479.
11. Oko A., Idasiak-Piechocka I., Pawlaczyk K., Wruk M., Pawlaczyk E., Czekalski S. // Ann. Transplant. 2002. V. 7. № 2. P. 51–53.
12. Sheng Sun D., Iwagaki H., Ozaki M., Ogino T., Kusaka S., Fujimoto Y., Murata H., Sadamori H., Matsukawa H., Tanaka N., Yagi T. // Transpl. Immunol. 2005. V. 14. № 1. P. 17–20.
13. Diaz-Peromingo J.A., Gonzalez-Quintela A. // Eur. Surg. Res. 2005. V. 37. P. 45–49.
14. Ikebukuro K., Adachi Y., Yamada Y., Fujimoto S., Seino Y., Oyaizu H., Hioki K., Ikehara S. // Transplantation. 2002. V. 73. P. 512–518.
15. Chalermkulrat W., McKinnon K.P., Brickey J.W., Neuringer I.P., Park R.C., Sterka D.C., Long B.R., McNeillie P., Noelle R.J., Ting J.P., Aris R.M. // Thorax. 2006. V. 61. № 1. P. 61–67.
16. Nakagawa K., Matsuno T., Iwagaki H., Morimoto Y., Fujiwara T., Sadamori H., Inagaki M., Urushihara N., Yagi T., Tanaka N. // J. Int. Med. Res. 2001. V. 29. P. 119–130.
17. Watanabe T., Kudo M., Chiba T., Wakatsuki Y. // Hepatol. Res. 2008. V. 38. P. 441–449.
18. Gaczynska M., Rock K.L., Goldberg A.L. // Enzyme Protein. 1993. V. 47. № 4–6. P. 354–369.
19. Cong Y., Konrad A., Iqbal N., Hatton R.D., Weaver C.T., Elson C.O. // J. Immunol. 2005. V. 174. № 5. P. 2787–2795.
20. Trombetta E.S., Mellman I. // Annu. Rev. Immunol. 2005. V. 23. P. 975–1028.
21. Basler M., Kirk C.J., Groettrup M. // Curr. Opin. Immunol. 2013. V. 25. № 1. P. 74–80.
22. Карпова Я.Д., Божок Г.А., Люпина Ю.В., Лёгач Е.И., Астахова Т.М., Степанова А.А., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. // Изв. АН. Сер. биол. 2012. № 3. С. 296–302.

23. Степанова А.А., Карпова Я.Д., Божок Г.А., Устиченко В.Д., Люпина Ю.В., Легач Е.И., Вагида М.С., Казанский Д.Б., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. // *Биоорган. химия*. 2014. Т. 40. № 1. С. 42–54.
24. Yunusov M.Y., Kuhr C.S., Georges G.E., Hogan W.J., Taranova A.G., Lesnikova M., Kim Y.S., Nash R.A. // *Transplantation*. 2006. V. 82. № 5. P. 629–637.
25. Божок Г.А. // *Проблеми ендокринної патології*. 2011. № 1. С. 60–66.
26. Marti H.P., Henschkowski J., Laux G., Vogt D., Seiler C., Opelz G., Frey F.J. // *Transpl. Int.* 2006. V. 19. P. 19–26.
27. Mackie F. // *Nephrology (Carlton)*. 2010. Suppl 1. S101–S105.
28. Лимфоциты. Методы Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. М.: Мир, 1990. 395 с.
29. Ahmad N., Gardner C.R., Yurkow E.I., Laskin D.L. // *Hepatology*. 1999. V. 29. № 3. P. 728–736.
30. Crispe I.N., Giannandrea M., Klein I., John B., Sampson B., Wuensch S. // *Immunol. Reviews*. 2006. V. 213. P. 101–118.
31. Bishop G.A., Wang C., Sharland A.F., McCaughan G. // *Immunol. Cell Biol.* 2002. V. 80. № 1. P. 93–100.
32. Fast L.D. // *J. Immunol.* 1996. V. 157. № 11. P. 4805–4810.
33. Stevanović S. // *Transpl. Immunol.* 2002. V. 10. № 2–3. P. 133–136.
34. Jin Y., Fuller L., Ciancio G., Burke G.W. 3rd, Tzakis A.G., Ricordi C., Miller J., Esquenazal V. // *Hum. Immunol.* 2004. V. 65. № 2. P. 93–103.
35. Polfliet M.M., Fabriek B.O., Daniëls W.P., Dijkstra C.D., van den Berg T.K. // *Immunobiology*. 2006. V. 211. № 6–8. P. 419–425.
36. Milner J.D., Orekov T., Ward J.M., Torres-Velez F., Junttila I., Sun G., Buller M., Morris S.C., Finkelmann F.D., Paul W.E., et al. // *Blood*. 2010. V. 116. № 14. P. 2476–2483.
37. Jenkins S.J., Ruckerl D., Cook P.C., Jones L.H., Finkelman F.D., van Rooijen N., MacDonald A.S., Allen J.E. // *Science*. 2011. V. 332. № 6035. P. 1284–1288.
38. Knolle P.A., Limmer A // *Swiss Med. Wkly*. 2003. V. 133. № 37–38. P. 501–506.
39. Limmer A., Ohl J., Wingender G., Berg M., Jungerkes F., Schumak B., Djandji D., Scholz K., Klevenz A., Hegenbarth S., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. № 10. P. 2970–2981.
40. Limmer A., Ohl J., Kurts C., Ljunggren H.G., Reiss Y., Groettrup M., Momburg F., Arnold B., Knolle P.A. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 12. P. 1348–1354.
41. Schurich A., Berg M., Stabenow D., Bottcher J., Kern M., Schild H.J., Kurts C., Schuette V., Burgdorf S., Diehl L., Limmer A., Knolle P.A. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. № 8. P. 4107–4114.
42. Niewerth D., Kaspers G.J., Assaraf Y.G., van Meerloo J., Kirk C.J., Anderl J., Blank J.L., van de Ven P.M., Zweegman S., Jansen G., et al. // *J. Hematol. Oncol.* 2014. 7:7. doi: 10.1186/1756-8722-7-7.
43. Khan S., van den Broek M., Schwarz K., de Giuli R., Diener P.A., Groettrup M. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. P. 6859–6868.
44. Heink S., Ludwig D., Kloetzel P.M., Kruger E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 9241–9246.
45. Chen S., Kammerl I.E., Vosyka O., Baumann T., Yu Y., Wu Y., Irmiler M., Overkleeft H.S., Beckers J., Eickelberg O., Meiners S., Stoeger T. // *Cell Death Differ.* 2016. Mar 18. doi: 10.1038/cdd.2016.3. [Epub ahead of print]
46. Tcke F., Zimmermann H.W. // *J. Hepatol.* 2014. V. 60. № 5. P. 1090–1096.
47. Bowen D.G., Zen M., Holz L., Davis T., McCaughan G.W., Bertolino P. // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 114. № 5. P. 701–712.
48. Kuniyasu Y., Marfani S.M., Inayat I.B., Sheikh S.Z., Mehal W.Z. // *Hepatology*. 2004. V. 39. № 4. P. 1017–1027.
49. Huang L., Soldevila G., Leeker M., Flavell R., Crispe I.N. // *Immunity*. 1994. V. 1. № 9. P. 741–749.
50. Lalor P.F., Shields P., Grant A., Adams D.H. // *Immunol. Cell Biol.* 2002. V. 80. № 1. P. 52–64.
51. Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. // *Cell Mol. Immunol.* 2016. V. 13. № 3. P. 267–276.
52. Perillo N.L., Pace K.E., Seilhamer J.J., Baum L.G. // *Nature*. 1995. V. 14. № 378 (6558). P. 736–739.
53. Müschen M., Warskulat U., Peters-Regehr T., Bode J.G., Kubitz R., Häussinger D. // *Gastroenterology*. 1999. V. 116. № 3. P. 666–677.
54. You Q., Cheng L., Kedl R.M., Ju C. // *Hepatology*. 2008. V. 48. № 3. P. 978–990.
55. Wan J., Benkdane M., Teixeira-Clerc F., Bonnafous S., Louvet A., Lafdil F., Pecker F., Tran A., Gual P., Mallat A., et al. // *Hepatology*. 2014. V. 59. № 1. P. 130–142.
56. Dangi A., Sumpster T.L., Kimura S., Stolz D.B., Murase N., Raimondi G., Vodovotz Y., Huang C., Thomson A.W., Gandhi C.R. // *J. Immunol.* 2012. V. 188. № 8. P. 3667–3677.
57. Groettrup M., Stander S., Stohwasser R., Kloetzel P.-M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 8970–8975.
58. Griffin T.A., Nandi D., Cruz M., Fehling H.J., van Kaer L., Monaco J.J., Colbert A. // *J. Exp. Med.* 1998. V. 187. P. 97–104.
59. Guillaume B., Chapiro J., Stroobant V., Colau D., van Holle B., Parvizi G., Bousquet-Dubouch M.P., Théate I., Parmentier N., van den Eynde B.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 43. P. 18599–18604.
60. Dahlmann B. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 591. P. 132–140.
61. Unno M., Mizushima T., Morimoto Yu., Tomisugi Y., Tanaka K., Yasuoka N., Tsukihara T. // *Structure*. 2002. V. 10. P. 609–618.