

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 616.155.32-089.843-06:616-092:612.017.1]-017.1]-074

В. О. Ткачев, Е. В. Гойман, А. П. Лыков, О. Т. Кудаева, О. П. Колесникова

ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОПОЭЗА В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

На ранних стадиях развития хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) можно выделить период, характеризующийся нейтро- и лимфопенией, имеющими преимущественно перераспределительный характер, и гиперплазией костного мозга. Перенос сингенных клеток также приводит к нейтро- и лимфопении у реципиентов, однако восстановление количества данных клеточных типов идет без периода овершута, характерного для мышей с индуцированной РТПХ. Возникающие в организме реципиентов иммунные реакции при индукции хронической РТПХ отменяют ингибирующее влияние собственно введения лимфоидных клеток на пролиферативную активность гемопоэтических клеток-предшественников. Кроветворные клетки-предшественники костного мозга оказываются вовлеченными в процесс развития хронической РТПХ начиная с ранних сроков.

В силу генетически обусловленных особенностей клеточного иммунитета мышей родительской линии перенос лимфоидных клеток в системе DBA/2 → (C57BL/6xDBA/2)F₁ приводит к развитию хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), что сопровождается поликлональной активацией В-клеток хозяина с формированием аутоиммунной патологии [7, 8]. Ранее было установлено, что хроническая РТПХ может развиваться по Th1-зависимому варианту, характеризующемуся выраженным иммунодефицитом, и по Th2-зависимому варианту, приводящему к возникновению гломерулонефрита, аналогичного по многим показателям поражению почек при системной красной волчанке (СКВ).

На сегодняшний день установлено, что индукция хронической РТПХ приводит к сочетанным нарушениям иммунопоза и гемопоэза на поздних сроках заболевания (более 4 мес), причем их характер и выраженность зависят от варианта течения хронической РТПХ [2]. В данной работе изучались изменения гемопоэза, возникающие на ранних сроках после индукции хронической РТПХ.

Материалы и методы. В опытах использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов (C57BL/6xDBA/2)F₁ в возрасте 2 мес, полученных из питомника "Рассвет" (Томск). Хроническую РТПХ вызывали переносом $65 \cdot 10^6$ лимфоидных клеток мышей линии DBA/2 реципиентам — гибридам C57BL/6xDBA/2 внутривенно двукратно с интервалом 6 дней [5]. В качестве контроля использовали мышей того же генотипа, пола и возраста, интактных и после переноса сингенных клеток в тех же количествах.

Содержание колониеобразующих единиц (КОЕ) в костном мозге (КМ) и пролиферативную активность гемопоэтических клеток-предшественников определяли по методу с использованием 0,9% метилцеллюлозной культуры [1] в собственной модификации. Клетки КМ выделяли из бедренной кости и ресуспендировали в 1 мл среды. Часть клеточной суспензии инкубировали с цитозин-арабинозидом в конечной концентрации 1 мг/мл в течение 1 ч. После инкубации клетки отмывали 3 раза и ресуспендировали в полной среде. Культивирование клеток КМ проводили в метилцеллюлозной культуре ("MethoCult M3430" StemCell Technologies) с добавлением эритропоэтина ("Recormon", "Boehringer Mannheim, Германия) в конечной концентрации 20 ЕД/мл в 96-луночных плоскодонных культуральных планшетах ("Costar", США) в суммарном количестве $20 \cdot 10^3$ клеток, разнесенных в 3 лунки. Инкубацию и культивирование проводили при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Колонии, содержа-

щие более 50 клеток, подсчитывали под инвертированным микроскопом на 14-е сутки. Определение количества клеток селезенки, периферической крови и КМ проводили стандартными методами. Относительное количество нейтрофилов и мононуклеарных клеток определяли путем микроскопирования мазков крови, окрашенных по Романовскому—Гимзе.

Содержание гемоглобина в крови определяли гемихромным методом с помощью тест-системы "Гемоглобин-Ново" ("Вектор-Бест" пос. Кольцово, Новосибирская обл.). За начало эксперимента условно была принята дата первого переноса лимфоидных клеток.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием непараметрического критерия U Вилкоксона—Манна—Уитни и коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение. Характерной особенностью мышей с хронической РТПХ является увеличение количества клеток селезенки [8] при сохранении массы тимуса. Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие хронической РТПХ наблюдается у всех мышей опытной группы уже с 1-й недели после начала эксперимента, тогда как перенос сингенных клеток не приводит к возникновению спленомегалии у реципиентов (табл. 1).

Перенос как сингенных, так и полуаллогенных лимфоидных клеток приводил на ранних сроках (1-я и 2-я недели) наблюдения к выраженной нейтро- и лимфопении (табл. 2). Однако восстановление содержания лейкоцитов в периферической крови у мышей разных групп протекало по-разному. У мышей после сингенного переноса количество полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) и мононуклеаров восстанавливалось до их уровней у интактных животных к 4-й неделе, после чего достоверно не изменялось. Восстановление содержания лейкоцитов у мышей с индуцированной РТПХ протекало с выраженным овершуттом на 4-й неделе наблюдения и достигало их уровня у интактных мышей к 8-й неделе. Отмечено, что минимумы и максимумы содержания ПЯЛ и мононуклеаров в периферической крови совпадают по срокам.

В то же время содержание гемоглобина в крови у мышей после переноса как сингенных, так и полуаллогенных лимфоидных клеток не изменялось на протяжении всего эксперимента. Таким образом, у мышей опытной группы на протяжении первых 12 нед

Таблица 1

Масса тимуса и количество клеток селезенки у мышей разных групп

Группа мышей	Показатель	Срок эксперимента, нед					
		1	2	4	8	10	12
Без РТПХ — перенос сингенных клеток ($n = 4$)	Количество клеток селезенки ($\cdot 10^6$)	149,2 (129—186)	129,5 (112—140)	83,2 (74—94)	127,5 (117—135)	82,4 (65—105)	124,2 (110—153)
	Масса тимуса, г	44,3 (40—60)	48,3 (45—50)	49,0 (46—53)	46,3 (34—55)	48,3 (41—56)	50,5 (34—63)
С хронической РТПХ ($n = 5$)	Количество клеток селезенки ($\cdot 10^6$)	342,0* (252—476)	249,6* (205—330)	319,0* (144—443)	457,1* (295—576)	243,1* (122—388)	198,2* (170—225)
	Масса тимуса, г	48,4 (35—60)	46,8 (45—50)	49,2 (36—57)	53,2 (35—64)	48,0 (35—56)	38,3 (32—45)

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 приведены средние значения показателей, в скобках — пределы колебаний. У интактных мышей содержание клеток селезенки составляет $108,8 (81—150) \cdot 10^6$, масса тимуса — $46,2 (32—56)$ г. Звездочка — $p < 0,01$ по сравнению с интактными мышами.

отсутствовали признаки анемии (см. табл. 2). Индукция хронической РТПХ приводила к гиперплазии КМ реципиентов с увеличением количества миелокарицитов более чем в 2 раза в первые 2 нед эксперимента, тогда как количество клеток КМ мышей после переноса сингенных клеток достоверно не отличалось от такового у интактных мышей на протяжении всего срока наблюдения. Установлено, что пролиферативная активность гемопоэтических клеток-предшественников достоверно снижается на 1-й неделе после сингенного переноса. Это может свидетельствовать о наличии механизмов регуляции, направленных на восстановление нормальных значений численности клеток иммунной системы, причем контролируемым параметром может являться количество не только клеток-предшественников, но и зрелых лимфоцитов. Отсутствие достоверных изменений пролиферативной активности клеток у мышей с индуцированной РТПХ свидетельствует о том, что возникающие в организме реципиентов иммунные реакции приводят к активации костно-мозгового кроветворения, воздействуя на гемопоэтические клетки-предшественники и маскируя ингибирующий эффект собственно введения клеток (табл. 3).

Отмечена тенденция к увеличению содержания гранулоцитарно-макрофагальных КОЕ ($\text{КОЕ}_{\text{ГМ}}$) в КМ мышей опытной группы во всех контрольных точках, более выраженная на 1-й неделе (см. табл. 3). Увеличение колониестимулирующей активности у мышей с хронической РТПХ отмечено также Н. Нага и соавт. [3]. Не выявлено достоверных различий по количеству эритроидных КОЕ (КОЕ_e) в КМ между разными группами экспериментальных животных (см. табл. 3). Увеличение продукции эритропоэтических факторов отмечено у мышей с хронической РТПХ с использованием других линий экспериментальных животных [4].

Однако однократное определение на 14-е сутки эксперимента количества лейкоцитов в периферической крови, количества клеток КМ, содержания $\text{КОЕ}_{\text{ГМ}}$ у мышей с хронической РТПХ, индуцированной однократным переносом $5 \cdot 10^7$ клеток селезенки, проведенное Т. Могі и соавт., [6], не выявило различий между экспериментальными и интактными животными. На основании полученных результатов можно предположить, что лейкопения, возникающая у мышей опытной группы в первые 2 нед, сопровождающаяся гиперплазией КМ без

Таблица 2

Содержание лейкоцитов и гемоглобина в крови мышей разных групп

Группа мышей	Показатель	Срок эксперимента, нед					
		1	2	4	8	10	12
Без РТПХ — перенос сингенных клеток ($n = 4$)	Количество лимфоцитов, $\cdot 10^6/\text{мл}$	4,92* (3,4—7,6)	4,88* (4,0—5,5)	7,10 (6,0—8,6)	9,01 (8,2—10)	9,83 (8,4—10,5)	8,42 (7,6—9,5)
	Количество ПЯЛ, $\cdot 10^6/\text{мл}$	1,16* (0,8—1,4)	1,57* (1,1—2,2)	2,36 (2,1—2,9)	2,49 (2,3—2,8)	2,74 (1,9—3,2)	1,72 (0,9—2,5)
	Уровень гемоглобина, г/л	123,1 (106—139)	121,4 (107—132)	137,2 (130—150)	119,2 (101—129)	113,8 (105—119)	123,1 (107—134)
С хронической РТПХ ($n = 5$)	Количество лимфоцитов, $\cdot 10^6/\text{мл}$	2,72** (1,5—3,0)	3,32** (3,2—3,5)	11,36* (7,7—15)	9,73 (3,8—13,5)	5,86 (4,7—7,2)	6,99 (2,7—12)
	Количество ПЯЛ, $\cdot 10^6/\text{мл}$	0,99** (0,3—1,8)	1,10** (0,7—1,3)	4,02* (3,3—4,7)	3,17 (1,6—6,0)	1,82 (1,2—2,9)	2,11 (0,8—3,0)
	Уровень гемоглобина, г/л	142,6 (123—174)	120,4 (103—138)	123,7 (109—132)	114,6 (102—130)	97,9 (67—127)	101,6 (90—114)

Примечание. У интактных мышей содержание лимфоцитов в крови составляет $7,68 (4,9—10,6) \cdot 10^6/\text{мл}$, содержания ПЯЛ — $2,56 (1,5—4,9) \cdot 10^6/\text{мл}$, уровень гемоглобина — $116,6 (107,4—137,5)$ г/л. Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ по сравнению с интактными животными.

Показатели костно-мозгового кроветворения у мышей разных групп

Группа мышей	Показатель	Срок эксперимента, нед			
		1	4	8	12
Без РТПХ — перенос син- генных клеток (n = 3)	Количество клеток КМ, · 10 ⁻⁶	4,53 (3,8—5,2)	5,78 (5,4—6,2)	2,82 (1,8—3,6)	3,18 (2,6—3,6)
	Пролиферативная активность гемопоэтиче- ских клеток-предшественников, %	9,7* (1—15)	36,0 (1—40)	40,3 (30—77)	33,0 (18—43)
	Количество КОЕ _{гм}	230 (130—314)	217 (187—248)	256 (33—404)	196 (153—256)
	Количество БОЕ ₃ и КОЕ ₃	15 (1—26)	56 (31—80)	51 (50—52)	40 (13—55)
С хронической РТПХ (n = 5)	Количество клеток КМ, · 10 ⁻⁶	10,5** (7,0—12,0)	8,0* (4,0—10,5)	3,2 (2,5—4,1)	4,0 (3,4—5,0)
	Пролиферативная активность гемопоэтиче- ских клеток-предшественников, %	32,0 (14—50)	35,8 (20—69)	40,8 (22—61)	27,5 (10—45)
	Количество КОЕ _{гм}	426 (236—616)	364 (147—522)	384 (170—666)	307 (270—377)
	Количество БОЕ ₃ и КОЕ ₃	70 (56—105)	63 (40—98)	49 (21—66)	80 (68—100)

Примечание. В группе интактных мышей содержание клеток в КМ бедренной кости составляет 3,91 (2,8—6,3), пролиферативная активность гемопоэтических клеток-предшественников (процент клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла) — 36,8 (28—41), количество КОЕ_{гм} — 260,2 (126—374), количество БОЕ₃ и КОЕ₃ в бедренной кости — 51,8 (17—79). Одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$ по сравнению с интактными мышами.

уменьшения содержания КОЕ_{гм}, имеет перераспределительный характер. Она может являться результатом снижения миграции клеток различной степени дифференцировки из КМ в системный кровоток либо усиления выхода клеток из сосудистого русла в ткани. Овершут, характерный для мышей с РТПХ, может быть связан с отсутствием ингибирующего влияния переноса полуаллогенных лимфоидных клеток на пролиферативную активность гемопоэтических клеток-предшественников и с активацией гранулоцитарного роста гемопоэза.

Таким образом, после индукции хронической РТПХ можно выделить "острый" период, характеризующийся нейтро- и лимфопенией (уменьшение количества нейтрофилов и мононуклеаров в крови более чем в 2 раза) и гиперплазией КМ без достоверных изменений пролиферативной активности гемопоэтических клеток-предшественников и содержания КОЕ_{гм} эритроидных бляшкообразующих единиц (БОЕ₃) и КОЕ₃, продолжительностью 2 нед после первого введения полуаллогенных клеток. Именно в данные сроки (1-я неделя в моделях с однократным переносом) на фоне Th2-зависимой поликлональной активации В-клеток происходит выбор пути дальнейшего развития РТПХ по острому или хроническому типу, что в конечном счете определяется количеством и функциональной актив-

ностью переносимых CD8⁺ Т-клеток [7]. По-видимому, в этот период определяется и вариант течения хронической РТПХ.

Следовательно, кроветворные клетки-предшественники различной степени дифференцировки не только оказываются вовлеченными в процесс развития хронической РТПХ на поздних стадиях, что может быть обусловлено сформировавшимися патологическими процессами, но и могут активно участвовать в развитии самой реакции на ранних сроках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П. Методы культуры тканей в гематологии. — Томск, 1992.
2. Сухенко Т. Г. Сочетанные нарушения эритро- и иммунопоэза при экспериментальных вторичных иммунодефицитах и методы их коррекции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Новосибирск, 1996.
3. Hara H., Kitamura Y., Kawata T. et al. // Exp. Hematol. — 1974. — Vol. 2, N 1. — P. 43—49.
4. Kanamaru A., Okamoto T., Matsuda K. et al. // Exp. Hematol. — 1984. — Vol. 12, N 11. — P. 763—767.
5. Kimura K., Shimada K., Kanai Y. // Clin. Exp. Immunol. — 1987. — Vol. 69, N 2. — P. 385—393.
6. Mori T., Nishimura T., Ikeda Y. et al. // Blood. — 1998. — Vol. 92, N 1. — P. 101—107.
7. Rus V., Svetic A., Nguyen P. et al. // J. Immunol. — 1995. — Vol. 155, N 5. — P. 2396—2406.
8. Via C. S., Shearer G. M. // Immunol. Today. — 1988. — Vol. 9. — P. 207—213.

Поступила 23.09.05