

КОРРЕКЦИЯ АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИИ ПЕРЕНОСОМ КЛЕТОК СИНГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Введение

В настоящее время трансплантация стволовых клеток используется в терапии многих патологических состояний, в том числе аутоиммунных заболеваний, однако механизм корригирующего действия во многих случаях остается неясным. Известно, что перенос родительских лимфоидных клеток мышам-гибридам F1 при определенных генетических сочетаниях донор-реципиент индуцирует хроническую реакцию «трансплантат против хозяина» (хРТПХ), результатом которой является формирование болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ) аутоиммунного генеза. Так, хРТПХ, индуцированная в полуалогенной модели DBA/2→(C57Bl/6xDBA/2)F1, приводит к развитию у части реципиентов аутоиммунного гломерулонефрита, по ряду признаков аналогичного аутоиммунному заболеванию человека — системной красной волчанке (СКВ). В данной работе изучалась возможность коррекции аутоиммунного состояния реципиентов переносом клеток сингенного костного мозга.

Материал и методы исследования

В работе использовали мышей-гибридов первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1 B6D2F1 и мышей линий DBA/2, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (г. Новосибирск). В опытах использовались мыши-самки в возрасте 2–8 мес. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Хроническую РТПХ индуцировали у мышей путем переноса гибридам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Клетки лимфатических узлов и селезенки, выделенных *ex tempore*, вводили в/в реципиентам в дозе $(60-70) \cdot 10^6$ клеток двукратно с интервалом в 5 дней (M. Kimura et al., 1987). В качестве контрольной группы использовали интактных животных того же генотипа, пола, возраста, что и в опыте.

Гуморальный иммунный ответ на ЭБ (IgG-АОК/сел) оценивали на пике ответа, свойственного данному генотипу, по количеству локальных зон гемолиза после внутривенного введения $2 \cdot 10^8$ ЭБ. Концентрацию IgG в периферической крови, содержание подклассов IgG и антител к ДНК в сыворотке крови определяли твердофазным вариантом метода иммуноферментного анализа (Д. Кэтти, Ч. Райкундалиа, 1991). Интенсивность реакции оценивали на многоканальном спектрофотометре «Multiskan» при $\lambda = 492$ nm. Калибровочную кривую строили по препаратам IgG или соответствующим подклассам («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_о/OD_к).

Развитие поражения почек определяли по появлению белка в моче в концентрации более 3 мг/мл, что, как было показано ранее, коррелирует с развитием гломерулонефрита. Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Кумасси бриллиантовый синий (Kum Sai brilliant blue, Loba Feinchemie), измеряли с помощью Titertec Multiskan при $\lambda = 570$ nm. Калибровочную кривую строили по BSA (100–1 000 мкг/мл), результаты выражали в мг/мл.

Животных подвергали тотальному летальному облучению в дозе 850 R. Костный мозг получали из бедренной кости. Выделенную бедренную кость очищали от мышечных волокон, протирали стерильным марлевым тампоном и вскрывали костномозговой канал путем удаления эпифизов. С помощью иглы и шприца вымывали содержимое кости средой. Клетки костного мозга ресуспендировали путем пропускания через иглы уменьшающего диаметра, фильтровали через металлическую сеточку и 2–3 раза отмывали центрифугированием со сменой среды.

Почки животных фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере, обезвоживали в градиенте этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Срезы окрашивали ге-

матоксилином и эозином, изучали на световом микроскопе при увеличении до 1 200 раз. Для морфометрии применяли квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. При использовании объектива с увеличением $\times 10$ конечная площадь тестового квадрата была равна 625 мкм^2 (сторона квадрата 25 мкм), при использовании объектива с увеличением $\times 25$ — 100 мкм^2 (сторона квадрата 10 мкм), при использовании объектива с увеличением $\times 40$ — 36 мкм^2 (сторона квадрата 6 мкм). Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни (Е.В. Гублер, 1978).

Результаты и их обсуждение

В предварительных экспериментах мыши, у которых сформировался аутоиммунный гломерулонефрит (lupus-реципиенты), были летально облучены и восстановлены большим количеством клеток костного мозга интактных сингенных животных ($28 \cdot 10^6$ в первом опыте и $8 \cdot 10^6$ во втором). Через месяц протеинурия, которую рассматри-

вали как признак поражения почек, у lupus-реципиентов исчезла.

Для дальнейшего изучения возможности коррекции данного иммунопатологического состояния мы проводили исследования, уменьшив количество клеток костного мозга для восстановления после облучения, чтобы приблизить схему опыта к реальным условиям клинической практики. Мышей с хронической БТПХ (lupus-реципиенты) летально облучали (850 R) и затем переносили им клетки костного мозга ($2 \cdot 10^6$) сингенных интактных доноров. Для мониторинга развития последующих процессов регулярно определяли концентрацию белка в моче. В конце наблюдения животных иммунизировали оптимальной дозой ЭБ и определяли массу тела, тимуса и селезенки, количество клеток и число IgG-АОК в селезенке, уровень IgG, подклассов IgG и содержание антител к ДНК в периферической крови.

Обнаружено, что летальное облучение lupus-реципиентов с последующим восстановлением животных клетками сингенного интактного костного мозга приводит к снижению до контрольных значений уровня антител против ДНК и концентрации белка в моче (табл.).

Таблица

Характеристика иммунных параметров мышей с хРТПХ, летально облученных и восстановленных клетками костного мозга (M, min-max)

Показатель	Интактные N = 10	Контроль облучения N = 15	Lupus-реципиенты N = 15
P тимуса, мг	59,7 44 – 68	34,6 31 – 37	26,0* 17 – 33
P селезенки, мг	110,3 95 – 120	82,0 62 – 111	104 80 – 105
белок в моче, мг/мл	1,5	1,5	до облучения – 9,0* после облучения – 1,9
уровень dsДНК антител, оп. пл.	0,08	0,08	до облучения – 0,33* после облучения – 0,07
$n \cdot 10^6$ кл/сел	131,0 107 – 159	162,1 108 – 225	131,2 109 – 197
IgG, мг/мл	1,30 0,9 – 1,6	1,56 0,9 – 2,4	1,54 0,8 – 2,4
IgG1, мг/мл	3,43 3 – 4	3,4 2,3 – 3,9	5,28 3,8 – 6,2
IgG2a, мг/мл	1,96 1,5 – 2,3	1,9 1,7 – 2,4	1,2 0,6 – 1,8
N IgG-АОК/сел	169520 53 695 – 766009	6170* 823 – 19110	1701* 150 – 4713

Примечание. * — достоверность различий по сравнению с интактным контролем.

Как видно из данных, представленных в таблице, несмотря на длительный срок наблюдения (6 мес.), восстановление клетками сингенного костного мозга летально облученных контрольных животных не приводит к полному восстановлению всех иммунных параметров до уровня интактных животных; масса тимуса и количество IgG-АОК остаются сниженными. На этом фоне у *lupus*-мышей масса тимуса оказывается также меньше по сравнению с интактными мышами. Не обнаружено различий в количестве клеток в селезенке и уровне IgG и подклассов IgG в периферической крови между интактными животными, контрольной облученной, восстановленной группой и *lupus*-мышами.

Коррекция аутоиммунного состояния *lupus*-мышей подтверждается морфологическими исследованиями. Летальное облучение *lupus*-мышей с последующим восстановлением сингенными клетками костного мозга останавливает дальнейшее развитие патологического процесса в почках: резко уменьшаются явления отека и выраженность воспалительной реакции в почках, хотя и не наблюдается обратного развития патологических изменений клубочков, поскольку почечные структуры в норме практически не способны к регенерации.

Заключение

Полученные данные позволяют сделать заключение, что состояние хронической БТПХ поддерживается в организме реципиентов на протяжении всего срока наблюдения (6 мес) активной деятельностью клеток. Летальное облучение отменяет это состояние у *lupus*-реципиентов, о чем свидетельствуют отсутствие спленомегалии и нормальный уровень IgG в периферической крови; прерывает развитие аутоиммунного процесса, доказательством чего может служить исчезновение антител к ДНК и клинических проявлений гломерулонефрита, но не корректирует полностью развившуюся в результате хРТПХ иммунодепрессию. Вероятно, причиной последнего является сама процедура летального облучения, которая и в контрольной группе, несмотря на последующий перенос клеток сингенного костного мозга, не приводит к полному восстановлению функций иммунной системы. По-видимому, для полного восстановления иммунных параметров как у контрольных, так и у *lupus*-реципиентов необходимо более длительное время и (или) большая доза клеток костного мозга.