

ЦИТОКИНЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 612.017.1.616.15

В.А.Козлов, О.П.Колесникова, Т.Г.Сухенко, П.Н.Филимонов, Е.В.Шкловская

СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОПОЭЗА И ПРОДУКЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 У МЫШЕЙ С РТПХ-ИНДУЦИРОВАННЫМИ ИММУНОДЕФИЦИТОМ И ИММУНОКОМПЛЕКСНЫМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Одной из актуальных проблем в изучении патогенеза аутоиммунных и иммунодефицитных состояний является раскрытие механизмов анемий, являющихся частым осложнением таких распространенных заболеваний человека, как ВИЧ-инфекция, системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит (РА) и др. Развивающийся при этих заболеваниях приобретенный иммунодефицит (ИД) способствует закономерному вовлечению в процесс системы мононуклеарных фагоцитов, которая в свою очередь является связующим и регуляторным звеном между иммунитетом и эритропоэзом. В литературе [12] имеются указания на связь повышенной продукции интерлейкина-1 (ИЛ-1), одного из основных макрофагальных цитокинов, с развитием анемического синдрома, и отсутствуют данные о связи этих показателей на экспериментальных моделях иммунопатологии.

В данной работе использованы отработанные нами модели ИД и иммунокомплексного гломерулонефрита (ИКГ), индуцированные реакцией трансплантат против хозяина (РТПХ) на мышях (C57BL/6×DBA/2)F₁ (B6D2F₁). У всех животных после переноса лимфоидных клеток отмечалось резкое подавление первичного гуморального им-

мунного ответа. После индукции РТПХ у части мышей по клиническим и морфологическим критериям наблюдалось поражение почек, обусловленное отложением иммунных комплексов на базальных мембранах клубочков, эта группа животных обозначена нами как группа с ИКГ. Другая группа мышей, у которых явления мезангиального гломерулонефрита отсутствовали, названа нами группой с ИД.

Целью нашей работы было изучение состояния эритропоэза и влияния на него ИЛ-1 на экспериментальных моделях.

Методика исследований. Эксперименты проводились на мышцах-самках гибридах первого поколения (B6D2F₁), полученных из экспериментально-биологической клиники животных Института клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН.

ИД и ИКГ индуцировали путем внутривенного переноса лимфоидных клеток в концентрации 50×10⁶ мышью одного из родителей [5]. Мыши на 6—7-м месяце с момента индукции РТПХ имели подавленный первичный гуморальный иммунный ответ, аутоиммунный синдром. У животных с ИКГ имелись морфологические, гистоиммунохимические критерии поражения почек, степень выраженности которых коррелировала с уровнем протеинурии, причем наиболее характерные для ИКГ изменения в почечной ткани соответствовали протеинурии в 3 мг/мл [2], поэтому нами были использованы мыши с протеинурией 3 мг/мл и более. Срок с момента индукции РТПХ мы условно считали "длительностью заболевания".

Мазки костного мозга окрашивали азур II-эозином по Папенгейму—Крюкову.

Оценку эритроидных бурсобразующих единиц (БОЕ-Э) проводили по общепринятой методике с использованием 0,3% агаровой культуры [1]. Все культуры выполнены в триплетах и более. Колонии подсчитывали на 8-й день, при этом учитывали колонии, содержавшие не менее 50 клеток.

Определение синтеза и секреции ИЛ-1 на перитонеальных макрофагах, стимулированных 10% раствором пептона, проводили по общепринятой методике [7]. В качестве стимулятора макрофагов использовали липополисахарид (ЛПС) *E.coli* в концентрации 25 мкг/мл. Активность ИЛ-1 оценивали методом измерения пролиферативного ответа тимоцитов мышей [1]. Супернатант тестировали в разведениях 1:2 и 1:4.

Некоторые показатели эритропоэза и продукции внеклеточного ИЛ-1 у мышей с ИД и ИКГ ($M \pm m$)

| Показатель | Разведение | Интактные мыши | Мыши с ИД | Мыши с ИКГ |
|---|------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Гемоглобин, г/л | | 179,0±2,87 | 165,7±2,31** | 150,0±7,3** |
| Гематокрит, % | | 49,5±0,54 | 46,4±0,53** | 40,5±1,99** |
| Содержание эритроидных ядросодержащих клеток в миелограмме, % | | 31,1±1,18 | 36,4±1,97** | 36,4±2,39* |
| Количество БОЕ-Э/10 ⁵ клеток костного мозга | | 7,8±1,3 | 14,3±2,4* | 19,6±3,0* |
| Продукция ИЛ-1: | | | | |
| спонтанная | 1:2 | 6 420,3±1 270 | 12 047,5±2 272* | 15 205,0±5 777* |
| | 1:4 | 5 280,5±955 | 11 143,4±2 053* | 16 553,2±6 571* |
| ЛПС-стимулированная | 1:2 | 33 510,3±4 127 | 29 339,33±5 007 | 61 565,7±25 014 |
| | 1:4 | 26 939,5±3 330 | 28 487,71±4 663 | 54 401,5±24 486 |

Примечание. Достоверность различий между контролем и опытом: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$. Значимость различий установлена с помощью U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Продукция ИЛ-1 оценивалась по включению ³H-тимидина и выражена в импульсах в минуту.

Результаты и обсуждение. В I серии экспериментов была предпринята попытка оценить состояние эритропоэза на различных уровнях в обеих группах мышей (с ИД и ИКГ) на 6—7-м месяце заболевания. Выявлено достоверное снижение уровня гемоглобина крови и гематокрита у животных с ИД и ИКГ (см. таблицу).

При цитологическом изучении мазков костного мозга в обеих группах обнаружены гиперплазия эритроидного ростка со сдвигом в сторону более молодых форм, увеличение количества митозов среди эритроидных клеток. Остальные ростки были сужены, их созревание не нарушено, усилен цитолиз. Подобная картина костного мозга соответствует описанной у больных СКВ [3].

Что касается эритроидных бурстобразующих свойств клеток костного мозга, то у животных с РТПХ-индуцированными ИД и ИКГ наблюдалось достоверное увеличение количества БОЕ-Э при культивировании клеток костного мозга в агаре (см. таблицу). Как известно, клетка—предшественница эритропоэза, БОЕ-Э, относится к ранним предшественникам клеток красного ряда. Следовательно, учитывая наличие анемии по показателям периферической крови и повышенного эритропоэза на уровне ранних клеток-предшественников, можно предположить либо неэффективный эритропоэз с блокадой дифференцировки, формирующийся на стадии БОЕ-Э или более зрелых предшественников, либо повышенное кроворазрушение. Подобные изменения в периферической крови и костном мозге у мышей с ИД и ИКГ могут быть обусловлены различными причинами: наличием аутоантител к эритроцитам [5], нарушением утилизации железа [9], повышением внутриклеточного гемолиза, влиянием неспецифических медиаторов воспаления, таких как ИЛ-1, фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), γ -интерферон. Наиболее приемлемой нам представляется гипотеза [10], объясняющая угнетение эритропоэза цитокинами стимулированных макрофагов. Согласно этой гипотезе, макрофаги, активированные в результате воспалительных и инфекционных процессов, продуцируют значительное количество ИЛ-1 и ФНО, ингибируя эритропоэз: кроветворение направляется по шунтовому пути — в сторону компенсаторного усиления грануло- и моноцитопоэза, стимуляции Т- и В-клеточного

звеньев иммунитета. Эту гипотезу подтверждают данные о корреляционной связи между повышенным содержанием ИЛ-1 и анемией при РА [12]. Так, анемия у больных РА, обусловленная подавлением поздних эритроидных предшественников, сопровождается повышенной продукцией ИЛ-1, при этом у лиц без анемического синдрома концентрация ИЛ-1 в сыворотке крови была нормальной или незначительно повышенной.

В экспериментах *in vitro* показаны стимулирующее действие ИЛ-1 на пролиферацию БОЕ-Э [14] и блокирующее действие на рост КОЕ-Э (колониобразующих единиц — более поздних предшественников эритропоэза) [10].

Введение рекомбинантного ИЛ-1 (рИЛ-1) *in vivo* мышам вызывало стимуляцию ранних (БОЕ-Э) и подавление поздних (КОЕ-Э) эритроидных предшественников в селезенке и костном мозге. При многократном введении рИЛ-1 мышам значительное снижение содержания КОЕ-Э сопровождалось анемией (снижением показателей гематокрита и процента ретикулоцитов) [11].

В качестве посредника ингибирующего влияния ИЛ-1 на эритропоэз выступает другой макрофагальный цитокин со сходным спектром действия — ФНО, который также вызывает эритросупрессию *in vivo* и *in vitro*. Однако для получения эквивалентных результатов необходимо в 10—100 раз больше ФНО, чем его содержится в макрофагальном супернатанте [10].

II серия экспериментов была посвящена изучению синтеза и секреции ИЛ-1 перитонеальными макрофагами мышей с ИД и ИКГ. Из таблицы видно, что на 6—7-м месяце заболевания у мышей с ИД и ИКГ по сравнению с интактными животными отмечается достоверное повышение спонтанной продукции внеклеточного ИЛ-1. При стимуляции перитонеальных макрофагов ЛПС повышения уровня ИЛ-1 у мышей с ИД не наблюдалось. В супернатанте макрофагов мышей с ИКГ повышение уровня ИЛ-1 в сравнении с контролем было статистически незначимым. Для внутриклеточного ИЛ-1 получены аналогичные результаты (данные не приводятся).

Высокий спонтанный уровень ИЛ-1 в супернатанте культуры моноцитов/макрофагов встречается при ряде аутоиммунных и иммунодефицитных заболеваний, таких как РА [12], ВИЧ-инфекции [13], причем при ВИЧ-инфекции обнаружен так-

же ингибитор ИЛ-1, скрывающий его более высокую выработку [6]. В экспериментальной работе [8] активированные макрофаги выделяли параллельно с ИЛ-1 его ингибитор. Вероятно, действием большего количества ингибитора ИЛ-1, чем его синтезируется спонтанно, можно объяснить отсутствие повышенной стимулированной ЛПС активности ИЛ-1 в сравнении с контролем в наших опытах у больных мышей.

Ранее [4] было показано, что незрелые эритроидные клетки в различных физиологических условиях проявляют иммунорегуляторные (супрессорные) свойства. Полученные нами данные свидетельствуют об иммунопатогенетической роли эритроидных клеток при иммунодефицитных состояниях.

Все изложенное выше позволяет предположить, что при ряде аутоиммунных и иммунодефицитных заболеваний повышение стимулированными макрофагами секреции ИЛ-1 наряду с механизмами компенсации усиливает иммунодефицит путем увеличения иммуносупрессивной активности ядросодержащих клеток эритроидных, а также вызывает анемию в связи с неэффективностью эритропоэза.

Знание патогенетической роли цитокинов в развитии иммунопатологических состояний, а также анемий позволяет проводить их направленную коррекцию, воздействуя как на иммунный ответ, так и на эритропоэз.

Выводы

1. У мышей с РТПХ-индуцированными ИД и ИКГ обнаружена нарастающая анемия, которая сочетается со стимуляцией ранних эритроидных предшественников и повышенным содержанием незрелых эритроидных клеток.

2. Установлена стимуляция системы мононуклеарных фагоцитов, приводящая к повышению спонтанной продукции ИЛ-1 у больных мышей.

3. У животных с ИД и ИКГ не отмечено достоверного увеличения ЛПС-стимулированной активности ИЛ-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. — Томск, 1992.
2. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Логинов В.В. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1991. — № 12. — С. 13—16.
3. Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология. — М., 1989.
4. Чеглякова В.В., Цырлова И.Г., Козлов В.А. // Всесоюзный съезд иммунологов, 1-й: Тезисы докладов. — Дагомыс, Сочи, 1989. — Т. 1. — С. 397.
5. Appleby P., Webber D.G., Bowen J.G. // Clin. exp. Immunol. — 1989. — Vol. 78, № 3. — P. 449—453.
6. Berman M.A., Sandborg C.I., Calabria B.S. et al. // Clin. Immunol. Immunopath. — 1987. — Vol. 42, № 1. — P. 133—140.
7. Cavaillon J.M. // Infect. and Immun. — 1989. — Vol. 57, № 3. — P. 791—797.
8. Dayer J.-M. // J. Rheum. — 1992. — Vol. 19. — Suppl. 32. — P. 59—60.
9. Espinouse D., Souteyrand P. // Cah. med. — 1982. — Vol. 8, № 10. — P. 581—583.
10. Furmanski P., Johnson C.S. // Blood. — 1990. — Vol. 75, № 12. — P. 2328—2334.
11. Johnson C.S., Keckler D.J., Topper M.I. et al. // Ibid. — 1989. — Vol. 73, № 3. — P. 678—683.
12. Maury C.P.J., Andersson L.C., Teppo A.-M. et al. // Ann. rheum. Dis. — 1988. — Vol. 47, № 12. — P. 972—978.
13. Roux-Lombard P., Modoux C. // Clin. Immunol. Immunopath. — 1989. — Vol. 50. — P. 374—384.

14. Schooley J.C., Kullgren B., Allison A.C. // Brit. J. Haemat. — 1987. — Vol. 67, № 1. — P. 11—17.

Поступила 09.11.93

ERYTHROPOIESIS AND INTERLEUKIN-1 PRODUCTION IN MICE WITH GVHR-INDUCED IMMUNODEFICIENCY AND IMMUNOCOMPLEX GLOMERULONEPHRITIS — V.A. Kozlov, O.P. Kolesnikova, T.G. Sukhenko, P.N. Filimonov, Ye.V. Shklovskaya

An increase of erythroid progenitors and enhancement of interleukin-1 (IL-1) secretion in mice with GVHR-induced immunodeficiency and immunocomplex glomerulonephritis followed by anaemia are reported in the paper. IL-1-mediated non-effective erythropoiesis and immunosuppressive effect of erythroid precursors are supposed.