

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

СОСТОЯНИЕ ИММУНО- И ЭРИТРОПОЭЗА У МЫШЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА НА ФОНЕ ИММУНОДЕФИЦИТА

Институт клинической иммунологии, Новосибирск

У мышей линии BALB/c индуцировали иммунодефицит путем переноса лимфоцитов, иммунных к аллоантигену. Данная модель является одной из экспериментальных моделей СПИДа. Цель работы — изучить нарушения иммуно- и эритропоэза мышей с иммунодефицитом. Состояние эритропоэза оценивали по уровню гемоглобина, гематокрита и содержанию ретикулоцитов в периферической крови, по количеству эритроидных бурсообразующих единиц и проценту эритрокариоцитов в костном мозге, а также по числу колониеобразующих единиц в селезенке на 5 и 8 сут. Обнаружено, что у мышей BALB/c на 5 — 6 мес заболевания развивается гипопластическая анемия, которая сопровождается пониженной фагоцитарной активностью макрофагов, а также сниженной продукцией интерлейкина 1 и фактора некроза опухоли. Сделано предположение, что дисфункция макрофагов является одной из причин гипопластической анемии у мышей с иммунодефицитом.

*T.G. Sukhenko, O.P. Kolesnikova,
P.N. Filimonov, V.A. Kozlov*

STATE OF IMMUNO- AND ERYTHROPOIESIS IN MICE WITH GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE ACCOMPANIED BY IMMUNODEFICIENCY

Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

In BALB/c mice immunodeficiency was induced by the transfer of lymphocytes immune to alloantigen. This model is one of experimental models of AIDS. The work was aimed at the study of disturbances in the immuno- and erythropoiesis in immunodeficient mice. The state of erythropoiesis was evaluated by the level of level of hemoglobin, hematocrit and the content of reticulocytes in peripheral blood, by the number of erythroid bursitis-forming units and the percentage of erythrokaryocytes in the marrow, as well as by the number of colony-forming units in the spleen by days 5 and 8. The study revealed that in BALB/c mice hypoplastic anemia, accompanied by the decreased phagocytic activity of macrophages and the reduced production of interleukin 1 and tumor necrosis factor, developed on months 5 — 6 of the disease. Macrophagal dysfunction was supposed to be one of the causes of hypoplastic anemia in immunodeficient mice.

Ключевые слова: иммунодефицит, эритропоэз, интерлейкин 1, фактор некроза опухоли, мыши

Key words: immunodeficiency, erythropoiesis, interleukin 1, tumor necrosis factor, mice

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени остаются недостаточно изученными механизмы развития анемии, сопровождающей заболевания с вторичными иммунодефицитами (ИД), а также регуляторные взаимодействия между иммунной системой и эритроном; мало адекватных моделей для изучения сочетанных нарушений эритро- и иммунопоэза. Имеются единичные работы, посвященные оценке эритропоэза на моделях системной красной волчанки (СКВ), ревматоидного артрита (РА), СПИДа и обычно затрагивающие отдельные его этапы.

В работе использована модель иммунодефицита, вызванного хронической болезнью трансплант против хозяина (БТПХ) на мышах BALB/c. Развивающееся при этом СПИД-подобное заболевание характеризуется подавлением Т-клеточного и стимуляцией В-клеточного звеньев иммунного ответа, активацией эндогенных ретровирусов [13]. На наш взгляд, данная модель имеет ряд преимуществ (простота воспроизведения, возможность стандартизации по морфологическим, клиническим, иммунологическим критериям, хроническое течение, не приводящее к быстрой смерти животных), что делает ее удобной для изучения сочетанных нарушений эритро- и иммунопоэза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на мышах-самцах линии BALB/c, полученных из питомника «Столбовая» (Москвы). Животных умерщвляли путем черепной дислокации. Всего использовано 120 мышей.

Имунодефицит на основе БТПХ у мышей BALB/c воспроизводили путем аллогенного переноса спленоцитов мышей C57BL/6 мышам BALB/c (первичные реципиенты) с последующим переносом вторичным реципиентам BALB/c лимфоцитов, иммунных к аллоантигену, от первичного реципиента [13]. В опытах использовали мышей на 5—6 мес заболевания, за начало заболевания условно принимали момент последнего переноса. Для контроля использовали интактных самцов BALB/c того же возраста.

Способность мышей к иммунному ответу (по количеству антителообразующих клеток (АОК) на эритроциты барана (ЭБ) оценивали на 4 сут по количеству зон гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом после внутривенного введения 2×10^8 ЭБ [5].

Ретикулоциты определяли в мазках периферической крови, окрашенных азуром II. Мазки костного мозга окрашивали азуром II-эозином по Палленгейму — Крюкову.

Подсчет эритроидных бурстобразующих единиц (БОЕв) проводили по общепринятой методике с использованием 0,9% метилцеллюлозной культуры [1].

Содержание стволовых кроветворных кле-

ток в костном мозге мышей определяли по числу колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) сублетально облученных сингенных реципиентов в различные сроки (на 5, 8 сут) после трансплантации им клеток костного мозга.

Для определения фагоцитарной активности перитонеальные макрофаги, стимулированные 10% р-ром пептона, культивировали в 24-луночных планшетах в концентрации 2×10^6 /мл с 2,5% опсонизированными ЭБ в течение 40 мин в полной среде 199. Количество фагоцитированных ЭБ в перитонеальных макрофагах измеряли спектрофотометрически по уровню гемоглобина после их разрушения детергентом [15].

Определение секреции интерлейкина 1 (ИЛ 1) перитонеальными макрофагами, стимулированными 10% р-ром пептона, проводили по общепринятой методике. Макрофаги (in vitro) стимулировали липополисахаридом (ЛПС) *Escherichia coli* в концентрации 15 мкг/мл. Активность интерлейкина 1 оценивали, измеряя пролиферативный ответ тимоцитов мышей на субоптимальную дозу конканавалина А [1]. Оценку результатов проводили с помощью индекса стимуляции (ИС). Супернатант культуры макрофагов тестировали в разведении 1:2.

Для определения уровня фактора некроза опухоли α (ФНО α) в макрофагальном супернатанте использовали ФНО α чувствительную клеточную линию L-929 [6]. Макрофагальный супернатант тестировали в разведении 1:100. Учет активности ФНО α оценивали по результатам суправитальной окраски монослоя клеток кристалвиолетом, при этом окончательно учитывали процент погибших клеток.

Статистическую обработку данных проводили непараметрическим способом с помощью U-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У мышей BALB/c индукция хронической реакции трансплантат против хозяина, по данной работе [13], приводит к активации эндогенного ретровируса и развитию заболевания, по клиническим и иммунологическим признакам сходного со СПИДом у человека: спленомегалия, диарея, снижение иммунной реакции на Т-зависимые и Т-независимые антигены, снижение пролиферативного ответа клеток селезенки на Т- и В-клеточные митогены, а также повышение уровня иммуноглобулинов в крови.

Обнаружено, что у мышей BALB/c после индукции БТПХ развивается иммунодефицит, о чем свидетельствовало подавление первичного гуморального иммунного ответа, снижение массы тела, спленомегалия (табл. 1); а также развитие вторичных инфекционных осложнений (конъюнктивит, диарея, дерматит). Подобные изменения в сочетании со снижением количества АОК в селезенке отмечают и на

Таблица 1. Показатели иммуно- и эритропоэза у интактных и больных мышей BALB/c ($M \pm m$)

Исследуемые показатели	Контроль	n	Мыши с ИД	n
Масса тела (г)	21,1±0,4	25	16,9±0,3*	20
Селезеночный индекс (%)	1,07±0,03	25	2,3±0,1*	20
Количество АОК/селезенку	168100±12653	15	60126±1232**	10
Фагоцитарная активность (усл. ед.)	351,6±14,6	15	205,13±9,3*	10
Продукция ИЛ 1 (ИС):				
Спонтанная	5,4±0,5	15	3,06±0,7*	10
ЛПС-стимулированная	10,3±0,8	15	5,6±1,1**	10
Продукция ФНО-α (%):				
Спонтанная	17,6±1,8	15	9,8±1,6*	10
ЛПС-стимулированная	42,4±2,9	15	24,5±2,1*	10
Уровень гемоглобина (г/л)	221,1±6,2	25	168,8±6,7*	20
Гематокрит (%)	55,1±0,7	25	48,1±0,8**	20
Ретикулоциты (%)	10,9±1,42	25	6,7±1,2**	20
Кол-во БОЕз/10 ⁴ ККМ	23,8±0,9	15	6,9±1,8**	10
Кол-во КОЕс-5/селезенку	15,1±0,6	20	2,1±0,9**	20
Кол-во КОЕс-8/селезенку	19,2±1,2	20	1,6±0,3**	20

Примечание. n — количество мышей. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

модели СПИДа у мышей, вызванной заражением ретровирусом LPBMS [4].

Характерной чертой СПИДа является поликлональная активация В-лимфоцитов. Ее раннее проявление — выраженная гипергаммаглобулинемия, затрагивающая основные классы иммуноглобулинов, обнаружена и у больных мышей BALB/c [13]. Вероятно, в развитии дисфункции В-лимфоцитов у больных СПИДом и мышей BALB/c имеет значение подавление функции Т-хелперов, а также дисбаланс регуляторных влияний разных типов Т-хелперных клонов. Нарушение нормального функционирования В-клеточной системы, по всей видимости, главным образом связано с невозможностью ответить на антигенную стимуляцию адекватной продукцией иммуноглобулинов, что может сопровождаться повышенной восприимчивостью к бактериальной инфекции, наблюдаемой у исследуемых нами мышей.

Описанные в работе [13] повреждения Т- и В-клеточного звена иммунитета у мышей BALB/c не могут не затрагивать макрофагальную систему, поэтому мы изучали фагоцитарную и секреторную функции макрофагов.

На 5 — 6 мес болезни у мышей BALB/c отмечалось снижение фагоцитоза на 42% по сравнению с интактными животными. Выявлено также снижение как спонтанной, так и ЛПС-стимулированной продукции цитокинов — ИЛ 1 и ФНО α — у больных животных (табл. 1).

Относительно продукции ИЛ 1 и ФНО α при СПИДе существуют противоречивые данные. Ряд авторов указывают на повышение секре-

ции этих факторов, по данным других — у больных СПИДом продукция ИЛ 1 и ФНО α моноцитами периферической крови снижена или не отличается от уровня здоровых доноров [15]. У больных I, II и III стадий заболевания секреция ИЛ 1 и ФНО α была значительно ниже, чем у больных IV стадии [9]. При стимуляции ЛПС моноцитами крови больных на стадии лимфоаденопатии и СПИД-ассоциированного комплекса секретируют сравнимые с клетками здоровых доноров количества ИЛ 1. Таким образом, уровень этих цитокинов зависит от стадии заболевания и развития интеркуррентной инфекции.

Можно предположить, что пониженная продукция ФНО α, ИЛ 1 наряду с низкой фагоцитарной активностью макрофагов у опытных мышей является одной из причин снижения Т-клеточной пролиферации, подавления первичного гуморального иммунного ответа, а также низкой резистентности больных животных, о чем свидетельствует развитие у них инфекционных осложнений (табл. 1).

При вирусиндуцированном ИД, в том числе СПИДе, анемия часто имеет характер гипопластической и связана либо с прямым цитопатическим действием вируса на эритробласты, либо с нарушением иммунной регуляции эритропоэза. В ряде случаев при СПИДе развивается гемолитическая анемия с аутоантителами к эритроцитам [8].

При исследовании периферической крови интактных и больных мышей выявлено снижение уровня гемоглобина (на 24%) и показателя гематокрита у больных животных по сравнению с контролем (табл. 1). Для уточнения характера анемии определяли содержание ретикулоцитов в периферической крови, относительное количество эритрокариоцитов, БОЕз в костном мозге и количество экзогенных селезеночных колоний — КОЕс-5 и КОЕс-8.

Обнаружено, что у мышей BALB/c с ИД относительное содержание ретикулоцитов в периферической крови было снижено на 39% по сравнению с контролем, что свидетельствует о гипорегенераторном характере анемии (табл. 1). В то же время при оценке миелограммы мышей с ИД наблюдали гиперклеточность костного мозга (за счет гранулоцитарного ряда), достоверное снижение количества эритрокариоцитов (на 37%), среди которых встречали дистрофически измененные. Грану-

Таблица 2. Клеточный состав мазков костного мозга у интактных и больных мышей BALB/c ($M \pm m$)

Клетки	Контроль	Мыши с ИД	p
Эритроидные формы	23,95±4,9	14,95±3,3	<0,05
Незрелые нейтрофилы	9,45±1,3	9,85±2,1	>0,05
Зрелые нейтрофилы	41,75±8,1	50,9±4,2	<0,05
Эозинофилы	1,7±0,4	2,2±1,3	>0,05
Лимфоидные формы	17,0±0,75	12,05±1,9	<0,05
Моноциты	5,05±1,8	6,75±1,5	>0,05
Ретикулярные клетки	1,1±1,1	3,1±1,1	<0,05

Примечание. К незрелым нейтрофилам относили промиелоциты, миелобласты, миелоциты, юные; к зрелым — палочкоядерные, сегментоядерные гранулоциты.

лоцитарный росток был гиперплазирован без нарушения созревания; количество лимфоидных клеток снижено (соотношение лейко/эритро у опытных мышей — 5,5:1, в контроле — 3:1) (табл. 2). Картина костного мозга у исследуемых нами больных мышей сходна с миелограммой больных СПИДом и СПИД-ассоциированным комплексом.

Выявлено значительное уменьшение БОЕэ в костном мозге мышей с ИД в сравнении с контролем. Подобное снижение количества БОЕэ при культивировании клеток костного мозга в метилцеллюлозе и процента эритроидных предшественников в мазках костного мозга отмечено у мышей, инфицированных ретровирусом LP-BM5 [14].

При оценке экзоканоничных селезеночных колоний (КОЕс-5 и КОЕс-8) у интактных и больных мышей BALB/c установлено, что на 5 — 6 мес болезни у мышей снижено количество КОЕс-5 (на 86%) и особенно КОЕс-8 (на 92%) по сравнению с контролем.

Таким образом, снижение уровня гемоглобина и гематокрита у мышей BALB/c на 5 — 6 мес болезни свидетельствует о развитии у них анемии, а наличие ретикулоцитопении, пониженного процентного содержания эритрокарицитов и количества БОЕэ в костном мозге является свидетельством ее гипопластической природы.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нормальных условиях осуществляется многофакторная регуляция гемопоэза. Для нормального эритропоэза необходимо адекватный уровень эритропоэтина, слаженное кооперативное действие лимфоцитов, клеток гемопозитического микроокружения, особенно макрофагов, а также цитокинов, стимулирующих (ИЛ 3, ИЛ 13, эритропоэтин) и ингибирующих (интерферон γ , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор — ГМ-КСФ, ФНО α) эритропоэза. Исследования последних лет показали, что ИЛ 1 (в сочетании с КСФ ИЛ 3 и ИЛ 6) вызывает усиление пролиферации полипотентных предшественников гемопоэза [10]. Действуя синергично с эритропоэтином, ИЛ 1 стимулирует рост БОЕэ как в костном мозге, так и в селезенке [11]. Пониженная продукция ИЛ 1 и действующих синергично с ним цитокинов и медиаторов (ИЛ 3, эритропоэтин, простагландин Е₂) может приводить к развитию гипоплазии. Из литературы известны также и ингибиторный эффект ИЛ 1 на эритропоэз, который опосредуется ФНО α и ГМ-КСФ [7] и опосредуется эритропоэтином. Как отмечено выше, у больных СПИДом продукция провоспалительных цитокинов зачастую ниже, чем у здоровых доноров. Однако, несмотря на то, что в культуральной среде мононуклеаров крови больных ВИЧ-инфекцией уровень ИЛ 1 и ФНО α был снижен, при ее фракционировании обнаружили, что моноциты больных продуцируют повышенное количество цитокинов, но их биологическое действие маскировалось присутствием ингибиторов [3, 12].

Таким образом, можно предположить, что наблюдаемая у исследуемых нами мышей дисфункция макрофагов является одной из причин нарушения эритропоэза. Подавление мак-

рофагальной активности у больных животных, очевидно, не ограничивается снижением только секреции ИЛ 1 и ФНО α . Подобная дисфункция, вероятно, сопровождается нарушением синтеза и секреции других эритропоэзстимулирующих факторов — ИЛ 3, эритропоэтина, суммарным итогом чего является прогрессирующее угнетение эритропоэза. С другой стороны, не исключено, что пониженная продукция противовоспалительных монокинов маскируется присутствием их ингибиторов, и гипопластическая анемия у мышей с ИД может быть объяснена сочетанным действием ИЛ 1 и ФНО α , которые, как известно, подавляют эритропоэз, но при этом стимулируют рост макрофагальных, гранулоцитарных и мегакариоцитарных предшественников. Это предположение подтверждают наши исследования. При подсчете миелограммы больных мышей сниженное количество ядросодержащих эритроидных предшественников сочеталось с гиперплазией гранулоцитарного ростков кроветворения. Это может свидетельствовать о нормальной или повышенной продукции макрофагами ГМ-КСФ.

Определенную роль в патогенезе гипопластической анемии у исследуемых нами мышей может иметь аутоиммунизация. Гипопластическая анемия встречается при многих аутоиммунных заболеваниях (рассеянный склероз, РА, СКВ). Выраженная гипоплазия костного мозга при аутоиммунных гемолитических анемиях обусловлена действием антиэритроцитарных антител, которые могут взаимодействовать и с ядросодержащими гемопоэтическими предшественниками [2]. Учитывая наличие у больных мышей В-клеточной поликлональной активации с гипергаммаглобулинемией [8], можно сделать предположение, что гипоплазия эритронов у них связана также и с действием аутоантител к разным костномозговым предшественникам.

Знание патогенетической роли цитокинов в развитии иммунопатологических процессов, осложненных анемическим синдромом, позволяет проводить их направленную коррекцию, воздействуя как на иммунный ответ, так и на эритропоэз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры тканей в гематологии. — Томск, 1992.
2. Bailey F.A., Lilly M., Bertoli L.F. et al.//Arthritis Rheum. — 1989. — V. 32. — P. 901 — 905.
3. Berman M.A., Sandborg C.I., Calabria B.S. et al.//Clin. Immunol. Immunopathol. — 1987. — V. 42, No. 1. — P. 133 — 140.
4. Cunningham R.C., Thacore H.R., Zhou P. et al.//Immunol. Res. — 1994. — V. 13, No. 1. — P. 21 — 28.
5. Cunningham A.J.//Nature. — 1965. — V. 207. — P. 1106 — 1007.
6. Flick D.A., Gifford G.E.//J. Immunol. Meth. — 1984. — V. 68. — P. 167 — 175.
7. Gharavi A.E., Mellors R.C., Elkon K.B.//Clin. Exp. Immunol. — 1989. — V. 78, No. 2. — P. 233 — 238.
8. Gilmore N. Causes and treatment of anemia in AIDS patients.//V Intern. conf. on AIDS. — Montreal, 1989. — P. 22.
9. Hober D., Haque A., Wattré P. et al.//Clin. Exp. Immunol. — 1989. — V. 78, No. 3. — P. 329 — 333.

10. *Icebuchi K., Ihle J.N., Hiria Y. et al.*//*Blood.* — V. 72. — P. 2007.
11. *Johnson C.S., Keckler D.J., Topper M.I. et al.*//*Ibid.* — 1989. — V. 73, No. 3. — P. 678 — 683.
12. *Kalincovich A., Livshits G., Engelmann H. et al.*//*Clin. Exp. Immunol.* — 1993. — V. 93, No. 3. — P. 350 — 355.
13. *Kim B.S., Hui K.M.*//*J. Immunol.* — 1985. — V. 135, No. 1. — P. 225 — 260.
14. *Magnani M., Brandi G., Rossi L. et al.*//*Brit. J. Haematol.* — 1993. — V. 84, No. 3. — P. 539 — 541.
15. *Rummage J.A., Leu R.W.*//*J. Immunol. Meth.* — 1985. — V. 77. — P. 155 — 163.

Точмунга 08.07.98