

## СОЧЕТАННЫЕ НАРУШЕНИЯ ЭРИТРО- И ИММУНОПОЭЗА У МЫШЕЙ (C57BL/6×DBA/2)F1 С ИММУНОДЕФИЦИТОМ, ИНДУЦИРОВАННЫМ РЕАКЦИЕЙ “ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА”, И ИММУНОКОМПЛЕКСНЫМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Т.Г.Сухенко, О.П.Колесникова, В.А.Козлов

*Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск*

Изучали нарушения эритро- и иммунопоэза у мышей B6D2F1 с иммунодефицитом, индуцированным реакцией “трансплантат против хозяина”, и иммунокомплексным гломерулонефритом. Обнаружено, что у животных на 6-7-м месяце заболевания развивается анемия, которая сочетается с повышением фагоцитарной активности макрофагов и продукции фактора некроза опухоли. Сделано предположение, что дисфункция макрофагов является одной из причин развития анемии.

**Ключевые слова:** иммунодефицит, гломерулонефрит, эритропоэз, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , мыши

Среди множества подходов к изучению механизмов развития иммунной недостаточности важным представляется изучение взаимосвязи иммуно- и гемо-(эритро-)поэза. В литературе влияние эритрона на иммунитет рассматривается преимущественно в физиологических условиях [3]. Имеются единичные работы, указывающие на дисфункцию эритропоэза как на одно из звеньев патогенеза иммунного заболевания. При моделировании иммунопатологических состояний (системной красной волчанки, СПИДа), как правило, не анализируют сочетанные нарушения эритро- и иммунопоэза или изучают отдельные этапы дифференцировки эритрона.

Ранее показано, что у мышей (C57BL/6×DBA/2)F1 (B6D2F1) индукция хронической реакции “трансплантат против хозяина” (РТПХ) приводит к развитию иммунодефицита (ИД) и аутоиммунного заболевания, сопровождающегося анемическим синдромом и сходного с системной красной волчанкой у человека [4]. В данной работе продолжено изучение сочетанных нарушений эритро- и иммунопоэза у больных мышей B6D2F1.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на мышках-самках B6D2F1, полученных из экспериментальной линии животных СО РАМН.

Индукцию РТПХ у мышей B6D2F1 осуществляли путем внутривенного переноса лимфоидных клеток родительской линии DBA/2 [10]. У животных 1-й группы к 6-7-му месяцу развился ИД без протеинурии, 2-й группы — клинически и морфологически подтвержденный иммунокомплексный гломерулонефрит (ИКГ).

Первичный гуморальный иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток в селезенке [8].

Ретикулоциты определяли в мазках периферической крови, окрашенных азуром II. Содержание створчатых кровяных пластинок в костном мозге определяли по числу колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) сублетально облученных сингенных реципиентов в различные сроки после трансплантации им клеток костного мозга [14].

Для определения фагоцитарной активности перитонеальные макрофаги культивировали с 2.5% опсонизированными эритроцитами барана. Количество фагоцитированных эритроцитов измеряли спектрофотометрически по уровню гемоглобина после обработки детергентом [12].

Уровень фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) в макрофагальном супернатанте определяли с помощью ФНО- $\alpha$ -чувствительной клеточной линии L-929 [9]. Супернатант собирали общепринятым способом, добавляли в лунки в разведении 1:100. Активность ФНО- $\alpha$  оценивали по результатам суправитальной окраски монослоса клеток кристалли violetom, окончательно учитывали процент погибших клеток.

Статистическую обработку данных проводили непараметрически с помощью  $U$  критерия Вилкоксона. Корреляционный анализ проводили с помощью критерия Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обнаружено, что у мышей B6D2F1 обеих групп после индукции РТПХ развивается ИД, о чем свидетельствует подавление первичного гуморального иммунного ответа. При исследовании массы селезенки больных мышей обнаружена спленомегалия, но показатель селезеночного индекса (отношение массы селезенки к массе тела в процентах) был повышен только у мышей с ИКГ. У животных обеих опытных групп СОЭ была повышена, а масса тела снижена (табл. 1).

Для морфологического исследования брали селезенку, лимфатические узлы, печень и почки. У всех животных имелись проявления ИД в виде атрофии лимфоидных органов. В органах найдена очаговая мононуклеарная инфильтрация, дистрофия и атрофия паренхимы. Изменения в почках были особенно выраженными у мышей с ИКГ, а у животных с ИД — минимальными: незначительная очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы и умеренная дистрофия паренхиматозных клеток. Подобные морфологические изменения в органах иммунной системы, печени и почках наблюдаются у боль-

ных системной красной волчанкой. Ранее показано, что степень морфологических изменений почечной ткани у мышей с ИД и ИКГ коррелирует с количеством белка в моче (табл. 2) [5]. Кроме того, у мышей с ИКГ развивался асцит, что в совокупности с высокой протенурией свидетельствует о наличии нефротического синдрома.

В предыдущих работах показано, что у мышей с ИД и ИКГ повышена продукция интерлейкина-1 [4]. В данной работе о состоянии макрофагов судили по активности фагоцитоза и продукции ФНО- $\alpha$ .

У мышей с ИД и ИКГ фагоцитарная активность макрофагов повышена по сравнению с контролем (табл. 1). У животных с ИД спонтанная продукция ФНО- $\alpha$  ниже, а липополисахаридстимулированная — практически не отличается от контрольных значений. У мышей с ИКГ спонтанная продукция ФНО- $\alpha$  не отличалась от таковой в контроле, стимуляция же макрофагов липополисахаридом приводила к достоверному повышению продукции цитокина по сравнению с контролем (табл. 2).

Ранее нами показано, что иммуносупрессивными свойствами обладают не только иммунокомпетентные клетки и некоторые цитокины, но и эритрокариоциты. Синтезируемый ими эритроцитарный супрессорный фактор подавляет гуморальный иммунный ответ [3] и может участвовать в развитии иммунодефицита у мышей.

В связи с этим был изучен эритропоз у больных животных. Ранее отмечено, что у мышей с ИД и ИКГ развивается анемия с повышенным содержанием эритрокариоцитов и эритроидных бурстобразующих единиц костного мозга [4]. Нами обнаружено, что анемия в обеих опытных группах сопровождается ретикулоцитозом (табл. 1), который соответствует выражен-

Таблица 1. Показатели иммунопоза и "красной" крови у мышей B6D2F1 с ИД и ИКГ ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль ( $n=20$ )	Мыши с ИД ( $n=15-20$ )	Мыши с ИКГ ( $n=10-15$ )
Масса тела, г	26.1 $\pm$ 0.8	22.40 $\pm$ 0.75*	21.3 $\pm$ 0.7*
СОЭ, мм/ч	1.3 $\pm$ 0.4	3.6 $\pm$ 0.4*	11.2 $\pm$ 3.3*
Селезеночный индекс, %	1.05 $\pm$ 0.40	1.2 $\pm$ 0.2	1.90 $\pm$ 0.25*
Количество антителообразующих клеток в селезенке	45 600 $\pm$ 1234	17 200 $\pm$ 1599*	12 600 $\pm$ 1120.5**
Фагоцитарная активность, усл. ед.	280.0 $\pm$ 15.2	502.7 $\pm$ 20.1*	1029.4 $\pm$ 34.2*
Гемоглобин, г/л	199.2 $\pm$ 3.6	169.6 $\pm$ 1.4*	140.3 $\pm$ 6.9*
Гематокрит, %	49.4 $\pm$ 0.4	44.90 $\pm$ 0.14*	38.8 $\pm$ 1.4*
Ретикулоциты, %	10.20 $\pm$ 1.32	15.9 $\pm$ 2.4*	21.3 $\pm$ 3.4*

Примечания. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  по сравнению с контролем.

**Таблица 2.** Почечная функция, состояние макрофагов и количество экзогенных селезеночных колоний у мышей с ИД и ИКГ ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль (n=20)	ИД (n=15-20)	ИКГ (n=10-20)
Протеинурия, г/л	0.30±0.06	0.54±0.30	6.6±0.5*
Продукция ФНО- $\alpha$ перитонеальными макрофагами, %			
спонтанная	12.20±0.45	4.1±1.6*	10.66±5.00
стимулированная липополисахаридом	40.8±3.9	41.0±4.2	54.8±4.0**
Количество экзогенных селезеночных колоний			
КОЕс-5/селезенку	10.4±1.5	13.1±2.1**	8.0±1.5**
КОЕс-8/селезенку	12.8±1.5	18.1±2.5*	12.3±1.9

ности анемического синдрома и свидетельствует о сохранной регенерации костного мозга. Обнаружены также изменения количества экзогенных селезеночных колоний на 5-е и 8-е сутки у подопытных животных: повышение количества КОЕс-5 и КОЕс-8 у мышей с ИД и снижение КОЕс-5 у мышей с ИКГ (табл. 2). КОЕс-5 — унипотентные эритроидные предшественники, обладающие меньшей способностью к самоподдержанию, чем КОЕс-8. В костном мозге мышей линии NZB наблюдали увеличение количества КОЕс-5 и КОЕс-8 [6].

Таким образом, анализируя данные литературы и результаты собственных исследований, можно заключить, что анемия у подопытных мышей развивается в результате усиленного гемолиза и имеет аутоиммунный характер. Это подтверждается наличием аутоантител к эритроцитам [10] и повышенным содержанием IgG в периферической крови мышей B6D2F1 с хронической РТПХ [11].

В развитии анемического синдрома у больных мышей определенной роль играет дисфункция макрофагального звена иммунитета. Как ФНО- $\alpha$ , так и интерлейкин-1, регулируя эритропоэз, принимают участие и в патогенезе аутоиммунной гемолитической анемии [2]. Так, цитокины стимулируют пролиферацию преактивированных В-лимфоцитов, влияя на синтез иммуноглобулинов [1], в частности IgG. Повышенную продукцию IgG наблюдают у больных системной красной волчанкой и связывают с высокой продукцией интерлейкина-1 [2]. У мышей линии NZB фракцию антиэритроцитарных антител составлял IgG<sub>2b</sub> [13], секреция которых усиливается под воздействием ФНО- $\alpha$  [1]. Нами также выявлена отрицательная корреляция между гематокритом и продукцией интерлейкина-1 у мышей с ИКГ (критерий Спирмена -0.94,  $p < 0.05$ ).

ФНО- $\alpha$  и интерлейкин-1 являются не только медиаторами иммунных реакций, но и провоспалительными цитокинами: они индуцируют

продукцию  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  в макрофагах, лейкоцитах и мезангиальных клетках, активируя ПОД мембран с последующим разрушением клеток почечной ткани [1]. Интерлейкин-1 и ФНО- $\alpha$  нарушают метаболизм арахидоновой кислоты (повышают продукцию простагландина  $E_2$ , тромбоксана А и других метаболитов), что способствует воспалительному процессу в почках [7].

Обнаруженное нами повышение продукции цитокинов у мышей с ИКГ сопровождается деструктивными изменениями в почечной ткани и высокой протеинурией, что не противоречит данным литературы.

Кроме того, ФНО- $\alpha$  опосредует развитие катехексии, воздействуя на адипоциты и усиливая катаболические процессы в организме [1]. Именно повышенной продукцией ФНО- $\alpha$ , обнаруженной у мышей с ИКГ, можно объяснить значительное снижение массы тела.

Ранее мы предположили, что гиперплазия эритроидного ростка кроветворения у мышей с ИД и ИКГ является одной из причин подавления гуморального иммунного ответа. Не обнаружено корреляции между количеством эритрокариоцитов в костном мозге и первичным гуморальным иммунным ответом.

Таким образом, полученные нами данные на экспериментальных моделях позволяют глубже понять патогенез вторичных ИД и развивающейся при них анемии у человека.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. - СПб., 1992.
2. Кетлинский С.А., Алексеева Т.Г., Перунов Н.Д., Симбирцев А.С. // Тер. арх. - 1993. - Т. 65, № 12. - С. 51-54.
3. Козлов В.А., Журавкин И.Н., Цырлова И.Г. Стволовая кроветворная клетка и иммунный ответ. - Бюльварск, 1982.
4. Козлов В.А., Колесникова О.П., Сухенко Т.Г. и др. // Иммунология. - 1995. - № 1. - С. 36-38.

5. Колесникова О.П., Кудалева О.Т., Логинов В.В. и др. // Вестн. АМН СССР. - 1991. - № 12. - С. 13-16.
6. Матросова В.В. Близкодействующая регуляция пролиферации ранних гемопоэтических предшественников в норме и при аутоиммунной патологии (экспериментальные исследования). Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Новосибирск, 1995.
7. Chaim J.O. // Immunol. Today. - 1992. - Vol. 13, N 4. - P. 122-125.
8. Cunningham A.J. // Nature. - 1965. - Vol. 207. - P. 1106-1107.
9. Flick D.A., Gifford G.E. // J. Immunol. Methods. - 1984. - Vol. 68. - P. 167-175.
10. Kimura M., Ida S., Shimada K., Kanai Y. // Clin. Exp. Immunol. - 1987. - Vol. 69, N 2. - P. 385-393.
11. Rolink A.G., Radaszkiewicz T., Melchers F. // J. Exp. Med. - 1987. - Vol. 165, N 6. - P. 1675-1687.
12. Rummage J.A., Leu R.W. // J. Immunol. Methods. - 1985. - Vol. 77. - P. 155-163.
13. Scott B.B., Sadigh S., Stow M. et al. // Clin. Exp. Immunol. - 1993. - Vol. 93, N 1. - P. 26-33.
14. Till G.E., McCulloch E.A. // Radiat. Res. - 1961. - Vol. 14, N 2. - P. 213-222.

Получено 26.07.99

