

УДК 616.71-018.46-003.93:612.014.48

## РОЛЬ ФАКТОРОВ СЫВОРОТКИ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ И МИЕЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ

*Е.А. Романова*

Институт микробиологии и иммунологии имени И.И.Мечникова АМН Украины, Харьков

### РЕЗЮМЕ

Изучено влияние сывороточных факторов на восстановление клеточности костного мозга и гемопоэза с 10-х по 90-е сутки после летального облучения мышей и трансплантации миелокариоцитов *per se*, а также обогащенных тимоцитами. Показано, что на этапе восстановления клеточного состава органа в сыворотке облученных животных преобладают стимулирующие факторы, тогда как после завершения этого периода положительный баланс сдвигается в сторону супрессорных факторов. Установлено, что стимулирующий эффект на пролиферацию гемопоэтических клеток наряду с иммуноглобулинами оказывают также факторы неиммуноглобулиновой природы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** факторы сыворотки, костный мозг, трансплантация

### ВВЕДЕНИЕ

Пересадка гемопоэтической ткани сегодня является единственным эффективным способом восстановления гемопоэза и иммуногенеза у больных гемобластозами, первичными иммунодефицитными состояниями, стойкой анемией, у лиц с радиационным поражением лимфомиелоидной ткани [1, 2, 3, 4, 5]. Однако, не всегда происходит приживление трансплантата и быстрое восстановление гемопоэза за счет донорских клеток. У больных в посттрансплантационный период часто наблюдаются длительные гемо- и иммунодепрессии [1, 5, 6, 7, 8]. Длительная задержка в восстановлении нормального функционирования лимфомиелоидных органов, в свою очередь, приводит к развитию серьезных осложнений инфекционной и неинфекционной природы [9, 10, 11, 12], способных в ряде случаев привести к фатальному исходу. В этой связи особый интерес представляют данные о механизмах регуляции гемопоэза и лимфопоэза в посттрансплантационный период. Известно, что регуляция гемопоэза в организме здоровых животных и человека осуществляется механизмами непосредственного клеточного взаимодействия и через цитокины, действующие дистантно [13, 14, 15]. Рядом работ показано значение лимфокинов, надпочечников и клеточного микроокружения в восстановлении костного мозга после облучения или воздействия цитостатиков [16, 17, 18]. Учитывая, что сыворотка животных и человека содержит биологически активные вещества, имеющие различную природу и происхождение, которые способны оказывать как стимулирующее, так и супрессирующее влияние на пролиферативные процессы в органах и тканях, а также процессы активации клеток и проявление их функций, целью настоящих исследований явилось

изучение влияния сыворотки на восстановление костного мозга после облучения и миелотрансплантации.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на мышах линии СВА 8-10-недельного возраста массой 20-22 г. Мышей-реципиентов облучали в дозе 9 Гр на установке РУМ-17. Костный мозг ( $5 \times 10^6$  клеток/мышь) и тимоциты ( $20 \times 10^6$  клеток/мышь) вводили внутривенно в первые 24 часа после облучения.

Эксперименты проведены на 2-х группах мышей: 1) облученных животных, получивших клетки костного мозга; 2) облученных животных, получивших клетки костного мозга и тимоциты. Клетки костного мозга выделяли путем вымывания из бедренных костей раствором "Гемодез". Тимоциты получали, используя среду Игла, содержащую 20% сыворотки, путем мягкой гомогенизации органов с последующей фильтрацией через капроновый фильтр. Перед введением клетки отмывали двукратно центрифугированием при 250 g в течение 10 минут, после чего ресуспендировали в свежем растворе "Гемодез".

Активность факторов сыворотки оценивали в культуре (*in vitro*) по проценту активирования или подавления включения  $^3\text{H}$ -тимидина в нормальные антиген-стимулированные сингенные и аллогенные клетки селезенки и интактные клетки костного мозга [19, 20]. Стимулированные клетки селезенки получали от мышей СВА и BALB/c через 1 сутки после внутрибрюшинного введения эритроцитов барана (5% суспензии, 0,5 мл). Клетки селезенки ( $4 \times 10^4$ ) и костного мозга ( $7,5 \times 10^4$ ) культивировали в 96-луночных планшетах в объеме 0,2 мл питательной среды в присутствии 20% изучаемой сыворотки. Контролем служили клетки, культивируемые в той же среде в присут-

вии сыворотки нормальных мышей. Уровень пролиферации клеток-мишеней оценивали по величине включения  $^3\text{H}$ -тимидина при добавлении (1 мКи) метки за 18 часов до окончания культивирования. Клетки костного мозга культивировали 5 суток, клетки селезенки - 3 суток. Уровень включения радиоактивной метки определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике "Westan-7800". Полученные данные выражали в абсолютных величинах (имп/мин), а также вычисляли процент стимуляции или ингибиции включения метки в опытные образцы по сравнению с контролем.

Освобождение сыворотки от иммуноглобулинов производили путем обработки сульфатом натрия [21].

Полученные данные обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования, проведенные на модели стимулированных клеток селезенки, показали, что в сыворотке облученных животных 1-й группы включительно по 20-е пострadiационные сутки, а в сыворотке животных 2-й группы - по 30-е сутки преобладают факторы со стимулирующими свойствами, а в последующие сроки до конца исследования доминируют факторы с супрессорной активностью (Табл.1).

Таблица 1  
Влияние сыворотки экспериментальных животных на уровень включения  $^3\text{H}$ -тимидина в стимулированные клетки селезенки

Сутки получения сыворотки	1 группа		2 группа	
	Уровень включения $^3\text{H}$ -тимидина в клетки (имп/мин)	Стимуляция (+) и ингибиция (-) включения $^3\text{H}$ -тимидина в клетки (%)	Уровень включения $^3\text{H}$ -тимидина в клетки (имп/мин)	Стимуляция (+) и ингибиция (-) включения $^3\text{H}$ -тимидина в клетки (%)
10	27730 ± 1401*	+22,3 ± 1,2	29226 ± 1461*	+28,9 ± 1,5
20	28864 ± 1478*	+27,3 ± 1,4	30791 ± 1539*	+35,8 ± 1,9
30	20817 ± 1093	-8,2 ± 0,5	25372 ± 1269	+11,9 ± 0,6
40	17504 ± 936*	-22,8 ± 1,2	20582 ± 1062	-9,3 ± 0,5
50	17323 ± 919*	-23,6 ± 1,2	20839 ± 1009	-8,1 ± 0,4
60	17850 ± 996*	-21,3 ± 1,2	20928 ± 1097	-7,7 ± 0,4
90	20565 ± 1094	-10,3 ± 0,6	22538 ± 1233	-0,6 ± 0,03

1) уровень включения  $^3\text{H}$ -тимидина в стимулированные клетки селезенки, культивированные в среде, содержащей сыворотку нормальных животных, составляет 22674±1032 имп/мин; в клетки, культивированные с эмбриональной сывороткой - 29281±1412 имп/мин;

2) \*- достоверность различий показателей опытных и контрольных образцов ( $p < 0,05$ )

Как следует из полученных данных, стимулирующая активность сыворотки животных 1-й и 2-й групп в этот период сходна с таковой эмбриональной сыворотки, богатой, как известно, ростовыми и стимулирующими факторами.

Анализ ингибирующих свойств показывает, что они достоверно проявляются только на 40-60-е сутки у животных 1-й группы, а у животных 2-й группы в этот срок имеют лишь тенденцию к повышению. В последующие сроки (на 90-е сутки) у животных 1-й группы супрессирующая активность сыворотки все же превосходит стимулирующую, а у животных 2-й группы к 90-м суткам сыворотка приобретает свойства, характерные для нормальных животных.

В следующей серии исследований, проведенных на модели интактных клеток костного мозга, нами было установлено, что сыворотка облученных животных как 1-й, так и 2-й группы, полученная на 40-90-е сутки после миелотрансплантации, не оказывает ингибирующего влияния на нестимулированные клетки (Табл.2). Как показывают результаты,

достоверных различий в уровне включения  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки костного мозга, культивированные в присутствии сыворотки животных 1-й и 2-й групп и сыворотки нормальных животных, не наблюдается. При этом нами было обнаружено, что сыворотка животных 1-й группы, полученная на 10-20-е сутки, и сыворотка животных 2-й группы, полученная на 10-30-е сутки после миелотрансплантации, достоверно повышает пролиферативный потенциал костномозговых клеток, о чем свидетельствует уровень включения в эти клетки  $^3\text{H}$ -тимидина.

Известно, что в качестве факторов сыворотки, способных супрессировать активную пролиферацию клеток, могут выступать аутоантитела. В наших исследованиях было установлено, что удаление из сыворотки облученных животных гамма-глобулинов несколько снижает, но не отменяет ее ингибирующего действия на пролиферативную активность стимулированных спленоцитов. Нами также было обнаружено, что Ig-истощенная сыворотка оказывает супрессивное действие как на сингенные, так и на

аллогенные клетки. Полученные данные позволяют заключить, что супрессорные факторы сыворотки имеют двойкую природу – иммуноглобулиновую и неиммуноглобули-

новую, и способны оказывать регуляторное влияние на репарационную активность костномозговых клеток и процессы гемопоэза.

Таблица 2

**Включение <sup>3</sup>H-тимидина (имп/мин) в интактные клетки костного мозга под влиянием сыворотки облученных животных**

Сутки получения сыворотки	Сыворотка животных	
	1 группа	2 группа
10	2888 ± 209*	3189 ± 201*
20	2905 ± 206*	3294 ± 215*
30	2154 ± 203	2817 ± 204*
40	2009 ± 112	2105 ± 123
50	1964 ± 101	2091 ± 114
60	2106 ± 103	2167 ± 108
90	2183 ± 102	2173 ± 103

1) уровень включения метки в интактные клетки костного мозга, культивированные в присутствии нормальной сыворотки составляет 2094 ± 102 имп/мин, в присутствии эмбриональной сыворотки – 2765 ± 209 имп/мин;  
 2) \*- достоверность различий показателей опытных и контрольных образцов (p < 0,05).

Результаты наших исследований свидетельствуют в пользу того, что на этапе восстановления гемопоэза и клеточности костного мозга после облучения и миелотрансплантации баланс стимулирующих и супрессорных факторов сыворотки сдвинут в сторону первых; в дальнейшем происходит инверсия этого соотношения, вследствие чего уже во втором пострадиационном месяце супрессорные факторы преобладают над стимулирующими. При этом следует заметить, что супрессорные факторы сыворотки оказывают ингибирующее действие только на активированные клетки, тогда как клетки с нормальным клеточным циклом и пролиферативным потенциалом подобному влиянию не подвергаются.

Настоящие и ранее полученные данные [22] указывают на то, что супрессорное действие сыворотки на пролиферативную активность клеток совпадает по времени с появлением в костном мозге клеток-супрессоров, что, по нашему мнению, служит совместным гуморально-клеточным механизмом ограничения перепроизводства клеток, когда восстановление нормальной их численности в органе завершилось или близится к концу.

Таким образом, можно заключить, что обогащение миелотрансплантата лимфоидными клетками способствует ускоренному восстановлению гомеостаза реципиентов, что, по нашему мнению, обусловлено регуляторным влиянием лимфоцитов на репаративные процессы в облученном организме.

**ВЫВОДЫ**

1. В период активной реконструкции кост-

ного мозга (до 30-х пострадиационных суток) в сыворотке облученных реципентов преобладают стимулирующие факторы. Их активность в отношении гемопоэтических клеток у реципиентов лимфомиелотрансплантата является более высокой, чем у животных, получивших миелонорициты *per se*.

2. После завершения интенсивного восстановления костного мозга ( в течение 2-го пострадиационного месяца) баланс сывороточных факторов у животных, защищенных миело- и лимфомиелотрансплантатом, сдвигается в сторону супрессорных активностей. При этом у реципиентов комбинированного трансплантата ингибирующие свойства сыворотки выражены слабее и период их действия является ограниченным по сравнению с супрессорными факторами сыворотки реципиентов костного мозга *per se*.

3. Супрессорные факторы сыворотки облученных реципиентов обоих видов трансплантата представляют собой как анти-тела, так и гуморальные субстанции неиммуноглобулиновой природы и оказывают ингибирующее влияние только на пролиферирующие клетки.

Перспектива дальнейших исследований регуляторных механизмов восстановления гемопоэза облученных реципиентов лимфомиелотрансплантата, по нашему мнению, состоит в исследовании молекулярных изменений в клетках костного мозга - мишенях, на которые направлено влияние, контролирующее репаративные процессы в облученном органе кроветворения.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Gale R.P., Buttrini A. // *Cancer Invest.* 1998. Vol.16. № 1. P. 66-71.
2. Madero L.L., Villa A.M. // *Sangre.* 1999. № 2. P.135-141.
3. Федоровская Н.А., Сведенцов Е.П., Шарыгин С.Л., и др. // *Терапевт. арх.* 1993. Т.65. № 3. С.92-95.
4. Collins R.N. // *Lancet.* 1997. № 9050. P. 881-887.
5. Stuki A., Leisenring W., Sandmaier B.M. et al. // *Blood.* 1998. №.8. P. 2742-2749.
6. Podesta M., Piaggio G., Frassoni f., et al. // *Blood.* 1998. № 6. P. 1959-1965.
7. Balduini C.L., Noris P., Giorgiani G., et al. // *Brit. J. Haematol.* 1999. № 3. P.723-729.
8. Булычева Т.И., Шпакова А.П., Дронова В.М., и др. // *Иммунология.* 2000. № 5. С.46 – 52.
9. Cooke K.R., Krenger W., Hill G., et al. // *Blood.* 1998. № 7. P. 2571-2580.
10. Лисуков И.А., Крючкова И.В., Кулагин А.Д., и др. // *Терапевт. архив.* 1998. № 7. С.78-79.
11. Carreras E., Bertz H., Arcese W., et al. // *Blood.* 1998. № 10. P. 3599-3604.
12. Toubert M.-E., Socie G., Gluckman E., et al. // *Brit. J. Haematol.* 1997. №2. P.453-457.
13. Чертков И.Л., Дризе Н.И. // *Гематол. и трансфузиол.* 2000. Т.45. № 4. С.38-42.
14. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М. Гомеостаз и реакция физиологических систем организма. Новосибирск. 1992. С.126-150.
15. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Хорева М.В., Соколова Е.В. Система цитокинов, комплемента и современные методы иммунного анализа. - М.: РГМУ. 2001. 158 с.
16. Дыгай А.М., Богдашин И.В., Шерстобоев Е.Ю., и др. // *Иммунология.* 1991. №2. С.20-26.
17. Polli E.E. // *Acta Haematol.* 1991. Vol. 86. № 5. P.155-161.
18. Peters W.P. // *Rev. Infect. Dis.* 1991. Vol. 13. № 7. P.993-996.
19. Young M.R., Ellis N.K., Young M.E., et al. // *Cell. Immunol.* 1987. Vol. 107. № 1. P.238-248.
20. Сидорович И.Г., Ляхов В.В., Власов А.А., и др. // *Иммунология.* 1987. № 4. С.67-69.
21. Получение препаратов иммуноглобулинов: Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина. 1987. 390 с.
22. Popov N.N., Romanova E.F. // *School of Fundamental Medicine Journal.* 1996. Vol. 2. № 1. P. 28-35.

## РОЛЬ ФАКТОРІВ СИРОВАТКИ У РЕГЕНЕРАЦІЇ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТВАРИН ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ ТА МІЄЛОТРАНС-ПЛАНТАЦІЇ

*О.А. Романова*

Інститут мікробіології та імунології імені І.І.Мечникова АМН України, Харків

### РЕЗЮМЕ

Вивчено вплив сироваткових факторів на відновлення клітинності кісткового мозку та гемопоезу з 10-ї по 90-у добу після летального опромінення мишей і трансплантації клітин кісткового мозку *per se*, а також збагачених тимоцитами. Показано, що на етапі відновлення клітинного складу органу у сироватці опромінених тварин превалюють стимулюючі фактори, тоді як після завершення цього періоду позитивний баланс зрушується у бік супресорних факторів. Встановлено, що стимулюючий ефект на проліферацію гемопоетичних клітин поряд з імуноглобулінами справляють також фактори неімуноглобулінові за природою.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** фактори сироватки, кістковий мозок, трансплантація

## THE ROLE OF SERUM FACTORS IN ANIMAL BONE MARROW REGENERATION AFTER INRADIATION AND MYELOTRANS-PLANTATION

*E.A. Romanova*

I.I. Mechnikov's Institute of Microbiology and Immunology, Kharkiv

### SUMMARY

The influence of serum factors on bone marrow cells and haemopoiesis restitution during 10-90 days after lethal irradiation of mice and myelocariocytes grafting *per se* and enriched by thymocytes bone marrow cells was studied. The prevalence of stimulating serum factors during the stage of cellular compound restitution and after termination this period the moving positive balance to the side of suppressing factors was determined. It was established, that not only immunoglobulins has the stimulating effect on haemopoietic cells proliferation, but also factors of non-immunoglobuline nature.

**KEY WORDS:** serum factors, bone marrow, transplantation