

СПОСОБНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ К ПРОДУКЦИИ МУЛЬТИКОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-3

Розанова О.Е.

ГУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С помощью иммуноферментного анализа изучена способность мононуклеаров периферической крови и костного мозга 36 больных апластической анемией к продукции мультиколониестимулирующего фактора интерлейкина-3. Установлено, что клетки иммунной системы больных продуцируют сопоставимое с нормой количество цитокина, и депрессия кроветворения при данном заболевании не может быть связана с недостаточным синтезом мононуклеарами интерлейкина-3, а обусловлена, по-видимому, другими причинами.

Ключевые слова: апластическая анемия, гемопоэз, интерлейкин-3, мононуклеары.

Rozanova O.E

CAPACITY OF MONONUCLEAR CELLS OF PERIPHERAL BLOOD AND BONE MARROW OF PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA TO PRODUCE MULTI-COLONY-STIMULATING FACTOR – IL-3

Abstract. The capacity of mononuclear cells of peripheral blood and bone marrow of 36 patients with aplastic anemia to produce multi-colony-stimulating factor – IL-3 have been studied. It was established that the cells of immune system produce the amount of cytokine comparable to normal values, and the depression of hemopoiesis in this disease is not connected with insufficient synthesis of IL-3 by mononuclear cells and is possibly due to other factors. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 4, pp 421-424)

Введение

Известно, что апластическая анемия (АА) является одним из самых тяжелых заболеваний системы крови с высокой летальностью, характеризуется выраженным угнетением эритро-, тромбо-, гранулопоэза и, как следствие, гипоклеточностью костного мозга и панцитопенией в периферической крови. Изучение ее особенностей проводится на протяжении многих лет, однако до сих пор не утихают споры относи-

тельно отдельных звеньев патогенеза заболевания. Среди основных концепций возможных механизмов развития депрессии кроветворения при данном заболевании, наряду с поражением стволовой клетки и дефектностью гемопоэтического микроокружения, важное место занимает гипотеза о том, что повреждение костного мозга может вызываться и поддерживаться иммунологическими механизмами [1]. Следует отметить, что последняя гипотеза привлекает к себе внимание все большего числа исследователей [12, 14]. В настоящее время установлено, что клетки иммунной системы (лимфоциты, макрофаги, моноциты) способны продуцировать многие цитокины, являющиеся гемопоэтическими факторами и оказывающие влияние на все этапы кроветворения. В зависимости от характера этого влияния, их условно разделяют на позитивные и негативные регуляторы гемопоэза. Це-

Адрес для переписки:

Розанова Ольга Егоровна
192239, Санкт-Петербург, ул. Димитрова, д.4,
корп. 1, кв. 137. Дом. тел.: (812) 261-05-03.
Служ. тел.: (812) 277-08-90.
E-mail: haematology@atlant.ru

лый ряд цитокинов: интерферон (IFN), фактор некроза опухоли (TNF) и другие, - могут снижать клоногенность всех типов предшественников гемопоэтических клеток, подавляя эритро-, тромбо- и гранулопоэз, в силу чего они относятся к негативным регуляторам гемопоэза [4]. Напротив, те факторы, которые поддерживают пролиферацию полипотентной стволовой клетки (PPSC), миелоидных, эритроидных и лимфоидных предшественников, стимулируя соответствующие ростки кроветворения, относят к положительным регуляторам. Это различные колониестимулирующие факторы, а также интерлейкины (IL) 1, 2, 3, 6, 11 и т.д. [5, 8]. В связи с этим, изучение синтеза цитокинов, продуцируемых мононуклеарами периферической крови и костного мозга у больных АА, является актуальным и способствует более глубокому пониманию сложных процессов иммунной регуляции гемопоэза и их нарушений при данном заболевании.

Следует отметить, что среди упомянутых выше положительных гемопоэтических факторов особое место занимает IL-3. Данный цитокин привлекает к себе внимание в силу ряда причин: во-первых, основным его продуцентом являются активированные Т-лимфоциты, во-вторых, IL-3 является ростовым и дифференцировочным фактором, известным как регулятор гемопоэза на уровне стволовых и наиболее ранних предшественников кроветворных клеток. Под влиянием IL-3 образуются колонии гемопоэтических клеток практически всех типов, которые производит костный мозг, в силу чего данный цитокин и получил название мультиколониестимулирующего фактора. Следует отметить, что структуре IL-3 и механизму его влияния на гемопоэз посвящено довольно много исследований [3, 11], однако роль данного цитокина в формировании депрессии кроветворения при АА изучена еще недостаточно. В зарубежной литературе имеются весьма противоречивые и, подчас, взаимоисключающие сведения по этому вопросу [6, 13], а в Российской Федерации подобные исследования практически отсутствуют. Учитывая это обстоятельство, а также, стремясь проанализировать роль иммуноопосредованных механизмов в развитии АА, нами была изучена способность клеток иммунной системы больных к продукции IL-3.

Материалы и методы

Объектом исследования служили мононуклеарные клетки периферической крови и костного мозга 36 больных тяжелой АА в возрасте от 19 до 65 лет, находившихся на лечении в гематологической клинике РосНИИ ГТ с 1998 по 2004 годы. В качестве контроля служили мононуклеары периферической крови 35 и мононуклеары костного мозга 10 практически здоровых людей – кадровых доноров крови - в возрасте от 22 до 65 лет.

Определение способности мононуклеарных клеток к продукции цитокинов проводили в два этапа.

1-й этап - индукция синтеза цитокинов: выделенные в стерильных условиях на градиенте плотности Lymphoprep (Sigma, $r=1,077$) мононуклеарные клетки в концентрации 2×10^6 /мл культивировали в течение 24 часов при 37°C и в условиях 5 % CO_2 в 96-луночных планшетах в количестве 2×10^5 на лунку. Для культивирования использовали среду RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. Мононуклеары культивировали как в присутствии индуктора (стимулированная продукция цитокинов), так и без него (спонтанная продукция). В качестве индуктора синтеза IL-3 использовали фитогемагглютинин в дозе 10 мкг/лунку. Все пробы ставили в триплетах. Супернатанты клеток после завершения культивирования снимали и исследовали на наличие цитокинов. 2-й этап - определение уровня цитокинов стандартным методом ИФА (BioSorce, Int., США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 5.5. Средние величины выражали в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, а m – стандартная ошибка. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли по критерию t Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Следует отметить, что исследование IL-3 связано с определенными трудностями: данный цитокин проявляет свою эффективность в очень маленьких концентрациях. Некоторые авторы считают, что у больных АА синтез IL-3 снижен, а спонтанная продукция его вообще не идентифицируется [7]. Однако имеются данные, что нестимулированный синтез данного цитокина *in vitro* в норме не превышает 1,5 пг/мл [10]. Следует также отметить, что некоторые исследователи связывают угнетение гемопоэза при АА с недостаточным синтезом положительных гемопоэтических факторов, в целом, и IL-3, в частности [9].

Как видно из данных, представленных в таблице 1, спонтанная продукция IL-3 клетками периферической крови больных АА в целом, почти не отличалась от показателей нормы, а индуцированная продукция данного цитокина даже имела тенденцию к повышению, что нашло отражение в более высокой величине индекса стимуляции. Спонтанная продукция IL-3 клетками костного мозга больных АА хотя и была в 1,5 раза снижена по сравнению с нормальными показателями, однако это отличие не являлось достоверным ($p > 0,05$). Индуцированная продукция IL-3 мононуклеарами костного мозга больных также не отличалась от показателей нормы. Следует отметить, что наличие спонтанной продукции какого-

Табл. 1. ПРОДУКЦИЯ IL-3 МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ (ПГ/МЛ)

Исследуемый материал	Продукция IL-3		
	Спонтанная	Индукцированная	Индекс стимуляции
Периферическая кровь больных	0,94±0,49	89,05±55,86	52,13±34,45
Периферическая кровь здоровых	1,00±0,46	55,19±23,61	46,34±15,07
Костный мозг больных	0,81±0,62	78,06±46,70	60,22±28,74
Костный мозг здоровых	1,25±0,71	78,75±40,93	67,00±40,40

либо цитокина *in vitro* свидетельствует о предсуществующей активации клеток *in vivo* и отражает интенсивность синтеза цитокина, происходящего в организме без какого-либо дополнительного воздействия; ответ же на индуктор *in vitro* отражает способность клеток отвечать *in vivo* на антигенную стимуляцию и свидетельствует о реактогенном потенциале организма [2]. Анализ спонтанной продукции IL-3 мононуклеарами периферической крови и костного мозга больных АА свидетельствует о том, что клетки иммунной системы при данном заболевании синтезируют вполне сопоставимое с нормой количество цитокина, а сохранная способность к его стимулированной продукции, выявленная и в периферической крови, и в костном мозге, свидетельствует о достаточно высоком реактогенном потенциале клеток больных в отношении продукции IL-3.

Таким образом, полученные данные позволяют считать, что аплазия костного мозга и панцитопения в периферической крови при АА не связаны с недостаточным синтезом клетками иммунной системы мультиколониестимулирующего фактора – IL-3.

Список литературы

1. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С. Апластическая анемия. – М.: Наука, 1995. – 232С.
2. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача.- СПб: Гиппократ, 1998.- 156С.
3. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. – СПб.: Гиппократ.1992. – 255С.

4. Орловская И.А., Шкловская Е.В., Козлов В.А. Негативные регуляторы гемопоэза. Гомеостатическая роль в формировании взаимоотношений между гемопоэтической и иммунной системами. //Иммунология.-1996.-№5.-С.8-13.

5. Фрейдли И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы (III-V). – СПб: Наука, 2001. – 392 С.

6. Bastion J., Campos L., Roubi N., Bienvenu J., Felman P., Dumonted C., Coiffier B. IL-3 increases marrow and peripheral erythroid precursors in chronic pure red cell aplasia presenting in childhood.//British J. of Hematol. – 1995. – V.89, №2. – P.413-416.

7. Hsu H.C., Tsai W.H., Chen L.J., Hsu M.L., Ing-Tiau Kio B., Ho H.C., Lin C.K., Wang S.J. Production of hematopoietic regulatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells in patients with aplastic anemia.//Exp. Hematol. – 1996. – V. 24, №1. – P.31-36.

8. Kitamura K. Clinical application of new cytokines.//Japanese J. of Clin. Pathol.-1993.-V.41, №4.-P.390-398.

9. Koijimas S. Hematopoietic growth factor and marrow stroma in aplastic anemia.//Int. J. Hematol. – 1998. – V. 87, №1. – P.19-28.

10. Miyamoto K., Tsuji K., Maekawa T., Asano S., Nakahata T. Inhibitory effect of interleukin-3 on early development of human B-lymphopoiesis.//Br. J. Hematol. – 2001. – V.114, №3. – P.690-697.

11. Muench M.O., Humeau L., Paek B., Ohkubo T., Lanier L.L., Albanese C.T., Barcena A. Differential effects of IL-3, IL-7, IL-15 and GM-colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors.//Exp. Hematol. – 2000. – V.28, №8. – P.961-973.

12. Nissen C., Schubert J. Seeing the good and bad in aplastic anemia: is autoimmunity in AA dysregulated or antineoplastic?//Hematol. J. – 2002. – V.3, №4. – P.169-175.

13. Teramura M., Mizoguchi H. Special Education: Aplas-

tic anemia.//Oncologist. – 1996. – V.1, №3. – P.187-189.

14. Young N.S. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia.//Semin. Hematol. - 2000. - V.37, №1. - P.3-14.

поступила в редакцию 19.01.2005

принята к печати 12.02.2005