

УДК 612.112.94+616.155.1-007.1

ОСОБЕННОСТИ СУПРЕССОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СУММАРНОЙ РИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ЛИМФОЦИТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС НА НАЧАЛЬНОМ ЭТАПЕ ТОРМОЖЕНИЯ ЭРИТРОПОЭЗА

¹Тишевская Н.В., ²Бабаева А.Г., ³Геворкян Н.М., ³Козлова Н.И.¹ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, e-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru;²ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва;³ФГБУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича», Москва

Суммарная РНК, выделенная из лимфоцитов селезенки крыс-доноров через 96 часов после кровопотери, обладает тормозящим эритропоэз действием. Добавление 2 мкг/мл или 4 мкг/мл РНК в культуру эритробластических островков, содержащую 0,5 МЕ/мл или 1,5 МЕ/мл эритропоэтина (модели физиологического и компенсационного эритропоэза соответственно), приводит к уменьшению процесса образования эритробластических островков *de novo* и *de repeto*, снижению показателя повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз и замедлению созревания эритробластов. Суммарная РНК лимфоцитов, выделенных из селезенки на начальном этапе торможения постгеморрагической регенерации эритроидной ткани, способствует усиленной адгезии лимфоидных клеток к эритробластическим островкам, «корона» которых представлена преимущественно созревающими эритробластами. Исследуемая суммарная РНК, возможно, способствует адгезии особой популяции лимфоидных клеток костного мозга к мембране центральных макрофагов зрелых эритробластических островков, или же под влиянием РНК, выделенной из лимфоцитов донора на стадии торможения эритропоэза, лимфоидные клетки, присоединившись к «короне» зрелых островков, начинают выделять биологически активные вещества, тормозящие процесс денуклеации оксифильных нормобластов.

Ключевые слова: лимфоциты, регенерация, морфогенетическая активность, эритропоэз, эритробластический островок

FEATURES OF SUPPRESSOR ACTION OF TOTAL RIBONUCLEIC ACID FROM LYMPHOCYTES ISOLATED FROM THE SPLEEN OF RATS IN THE BEGINNING OF BRAKING ERYTHROPOIESIS

¹Tishevskaya N.V., ²Babaeva A.G., ³Gevorkyan N.M., ³Kozlova N.I.¹South Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru;²Research Institute of Human Morphology, Moscow;³Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry V.N. Orekhovicha, Moscow

Total RNA isolated from rat donors spleen lymphocytes 96 hours after blood loss, has an inhibitory effect upon erythropoiesis. Addition of 2×10^{-6} g/ml or 4×10^{-6} g/ml of the RNA to the erythroblastic islet culture containing 0.5 IU/ml or 1.5 IU/ml of erythropoietin (models of physiological and compensatory erythropoiesis, correspondingly) leads to a reduction of the formation of erythroblastic islands *de novo* and *de repeto*, reduction of the rate of re-involvement of macrophages in erythropoiesis and slowing maturation of erythroblasts. Total RNA of lymphocytes isolated from the spleen at the initial stage of braking posthemorrhagic erythroid tissue regeneration, enhances the adhesion of lymphoid cells to erythroblastic islands «crown» of which is mainly represented by maturing erythroblasts. The examined total RNA may contribute to adhesion of a special bone marrow population of lymphoid cells to a membrane of central macrophages of mature erythroblastic islands or, under the influence of RNA isolated from donor lymphocytes at the stage of braking erythropoiesis, the lymphoid cells joining the «crown» of mature islets start to release biologically active substances which inhibit the oxyphilic normoblast denucleation process.

Keywords: lymphocytes, regeneration, morphogenetic activity, erythropoiesis, erythroblastic islet

Известно, что в ходе реализации своей морфогенетической функции Т-лимфоциты информируют организм реципиента не только о необходимости запуска программы пролиферации ткани, но и обо всех особенностях этого процесса, обусловленных исходным сигналом к регенерации, причем лимфоидные клетки способны переносить реципиентам информацию о стадии регенерационного ответа, развивающегося в организме донора [1, 8]. Ранее нами было установлено, что суммарная РНК лимфоидных

клеток обладает модулирующим эритропоэз действием в норме и при экспериментальной полицитемии [2, 3, 18], а суммарная РНК лимфоцитов пациентов с истинной полицитемией стимулирует пролиферацию и дифференцировку эритроидных клеток в культуре и в костном мозге крыс с бензольной анемией [4, 5]. Целью настоящего исследования явилось изучение эффекта суммарной РНК лимфоцитов, выделенных из организма животного в период начала торможения постгеморрагической проли-

ферации эритроидной ткани, на физиологический и компенсационный эритропоэз в культуре эритробластических островков (ЭО) костного мозга.

Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие Приказом Ростехрегулирования № 544-ст от 02.12.2009. Все манипуляции с животными производили под эфирным наркозом, эвтаназию грызунов осуществляли путем цервикальной дислокации, также проводимой под эфирным наркозом. 5 здоровым крысам-самцам массой 200–260 граммов было произведено кровопускание в объеме 2% от массы тела. Через 96 часов после кровопотери эти животные были выведены из эксперимента. Лимфоидные клетки из их селезенок выделяли путем суспендирования ткани в стеклянном гомогенизаторе, после чего взвесь фильтровали через капроновый фильтр и трижды отмывали суспензию клеток 0,9% раствором NaCl. Суммарную РНК, выделенную из лимфоцитов методом гуанидин тиоцианат – фенол – хлороформной экстракции по Хомчинскому, добавляли в чашки Петри непосредственно перед началом культивирования в концентрации 2 или 4 мкг/мл культуральной среды.

У 10 интактных крыс из костного мозга бедренных костей выделяли ЭО и культивировали их 24 часа в газопроточном мультигазовом инкубаторе [11]. Для моделирования физиологического эритропоэза в каждую чашку Петри добавляли по 0,5 МЕ/мл рекомбинантного эритропоэтина (ЭПО) человека «Рекормон» («Boehringer Mannheim GmbH», Германия), для моделирования компенсационного эритропоэза – по 1,5 МЕ/мл ЭПО [17]. Культивирование производилось при температуре 37°C, относительной влажности 95% и содержании CO₂ 4,5%. Всего в работе было проанализировано 30 культур ЭО.

В полученных препаратах определяли общее количество ЭО на 1 см² поверхности культурального сосуда и распределение их по классам зрелости [9,10]. «Корона» ЭО 1-го класса (ЭО1) была представлена проэритробластами и базофильными эритробластами с числом клеток от 2 до 8; «корона» ЭО 2-го класса (ЭО2) – базофильными и полихроматофильными эритробластами с числом клеток от 9 до 16; ЭО 3-го класса (ЭО3) содержали от 17 до 32 полихроматофильных и оксифильных эритробластов; «корона» инволюцирующих островков (ЭОинв) состояла из полихроматофильных, оксифильных эритробластов и ретикулоцитов с числом ядросодержащих клеток менее 16. Реконструирующиеся островки (ЭОрек) имели в своей «короне» как зрелые клетки (оксифильные эритробласты и ретикулоциты), так и молодые проэритробласты и/или базофильные эритробласты. Для оценки темпа развития ЭО в культуре использовались расчетные показатели интенсивности вовлечения КОЕэ в дифференцировку (ЭО1 + ЭОрек), созревания эритробластов (ЭО3 + ЭОинв / ЭО1 + ЭО2 + ЭОрек) и повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз (ЭОрек / ЭОинв). Кроме того, отдельно подсчитывали ЭО каждого класса зрелости, контактирующие с лимфоидными клетками.

Полученные результаты обрабатывались методами описательной статистики с расчетом средних зна-

чений, ошибки среднего, доверительных интервалов, стандартного отклонения. Сравнения групп проводились методами непараметрической статистики с использованием критериев Манна-Уитни и хи-квадрат.

Результаты исследования и их обсуждение

Присутствие препарата РНК лимфоцитов селезенки анемизированных животных в культуральной среде как в концентрации 2 мкг/мл, так и в количестве 4 мкг/мл приводило к нарушению физиологического темпа развития эритроидных клеток в ЭО (табл. 1). При анализе показателей развития ЭО в культуре было выявлено, что торможение эритропоэза развивается в результате подавления процесса присоединения КОЕэ к мембране центральных макрофагов и снижения темпа вовлечения свободных макрофагов в эритропоэз. Кроме того, о замедлении процесса дифференцировки и созревания эритроидных клеток свидетельствовало увеличение показателя созревания эритробластов, что, вероятно, было обусловлено замедлением процесса денуклеации оксифильных нормобластов в ЭО3 и ЭОинв, а также задержкой выхода ретикулоцитов из их «короны». Подобное явление торможения созревания эритроидных клеток в ЭО костного мозга было отмечено ранее при экспериментальной спленомегалии [19].

В модели компенсационного эритропоэза при добавлении исследуемой суммарной РНК лимфоцитов наблюдалась такая же картина угнетения формирования ЭО: через 24 часа культивирования снижалось число вновь образованных островков, замедлялся процесс вовлечения новых макрофагов в эритропоэз и увеличивалась продолжительность созревания эритробластов (табл. 2).

Известно, что интенсивность эритропоэза *in vitro* прежде всего зависит от дозы внесенного в культуру ЭПО, что было показано в работах по изучению динамики развития эритроидных клеток [13]. Однако супрессорное действие суммарной РНК, выделенной из лимфоцитов на этапе начала торможения эритропоэза в организме доноров, было отчетливо выражено даже в тех культурах ЭО, в которых равновесие между стимулирующими и угнетающими эритроидный рост факторами было смещено в сторону активации (модель компенсационного эритропоэза). При микроскопии препаратов культур ЭО, содержащих 1,5 МЕ/мл ЭПО, мы обратили внимание на необычайно частую встречаемость лимфоидных клеток в «короне» островков 3-го класса зрелости (табл. 3).

Таблица 1

Влияние суммарной РНК лимфоцитов селезенки анемизированных животных на развитие ЭО в модели физиологического эритропоэза

Расчетные показатели	0,5 МЕ/мл ЭПО (контроль)	0,5 МЕ/мл ЭПО + 2 мкг/мл суммарной РНК лимфоцитов	0,5 МЕ/мл ЭПО + 4 мкг/мл суммарной РНК лимфоцитов
Показатель интенсивности вовлечения КОЕэ в дифференцировку	18,7 ± 0,08	11,1 ± 0,07*	8,6 ± 0,05*
Показатель созревания эритробластов	2,8 ± 0,01	4,6 ± 0,02*	5,9 ± 0,02*
Показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз	0,23 ± 0,004	0,14 ± 0,001*	0,11 ± 0,001*

Примечание. * – достоверность различий между контрольными и опытными показателями (p < 0,05).

Таблица 2

Влияние суммарной РНК лимфоцитов селезенки анемизированных животных на развитие ЭО в модели компенсационного эритропоэза

	1,5 МЕ/мл ЭПО (контроль)	1,5 МЕ/мл ЭПО + 2 мкг/мл РНК лимфоцитов	1,5 МЕ/мл ЭПО + 4 мкг/мл РНК лимфоцитов
Показатель интенсивности вовлечения КОЕэ в дифференцировку	25,2 ± 0,1	19,3 ± 0,07*	11,6 ± 0,06*
Показатель созревания эритробластов	2,1 ± 0,03	2,7 ± 0,02*	4,2 ± 0,01*
Показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз	0,33 ± 0,001	0,23 ± 0,002*	0,12 ± 0,02*

Примечание. * – достоверность различий между контрольными и опытными показателями (p < 0,05).

Таблица 3

Влияние суммарной РНК лимфоцитов анемизированных животных на процентное содержание ЭО с лимфоидными клетками в «короне»

Условия культивирования	1,5 МЕ/мл ЭПО (контроль)	1,5 МЕ/мл ЭПО + 4 мкг/мл суммарной РНК
% ЭО 1-го класса	20,6 ± 1,6	15,8 ± 2,7
% ЭО 2-го класса	11,5 ± 1,3	8,1 ± 1,2
% ЭО 3-го класса	9,1 ± 1,8	26,5 ± 1,4 *
% ЭОинв	6,4 ± 0,5	8,6 ± 1,9
% ЭОрек	25,5 ± 2,1	19,6 ± 2,5

Примечание. * – достоверность различий между контрольными и опытными показателями (p < 0,05).

Ранее подобные подсчеты проводились нами при изучении влияния разных доз эритропоэтина на интенсивность эритропоэза *in vitro*, и было установлено, что наибольшее число контактов с лимфоидными клетками имеют островки с активно пролиферирующими клетками в «короне» – ЭО 1-го класса и реконструирующиеся ЭО [7, 12, 14, 16]. Однако при добавлении в культуральную среду исследуемой РНК наиболее часто с лимфоидными клетками стали контактировать ЭО 3-го класса зрелости, в которых одновременно наблюдалось замедление созревания оксифильных нор-

мобластов. Исходя из полученных данных, можно предположить, что к 96-му часу после кровопотери, при запуске программы торможения репаративной регенерации красного ростка кроветворения, суммарная РНК лимфоцитов способствует адгезии особой популяции лимфоидных клеток костного мозга к мембране центральных макрофагов зрелых ЭО, или же под влиянием РНК, выделенной из лимфоцитов донора на стадии торможения эритропоэза, лимфоидные клетки, присоединившись к «короне» зрелых островков, начинают выделять биологически активные вещества, тормо-

зание процесс денуклеации оксифильных нормобластов. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению количества ретикулоцитов, открепляющихся от «короны» ЭО и выходящих в культуральную среду (а в живом организме – в сосудистое русло). Подобный феномен привлечения лимфоидных клеток в процессы дифференцировки и созревания эритробластов был отмечен при изучении механизмов действия различных тормозящих эритропоэз соединений – молекул средней массы, выделенных из крови обожженных животных, и макрофагального колониестимулирующего фактора [6, 15].

Выводы

1. Суммарная РНК, выделенная из лимфоцитов селезенки доноров через 96 часов после кровопотери, тормозит эритропоэз *in vitro*.

2. Супрессорное действие исследуемой суммарной РНК проявляется и при физиологическом темпе развития эритроидных клеток, и в модели компенсационного эритропоэза, несмотря на повышенное в последнем случае содержание эритропоэтина в культуральной среде.

3. Под влиянием суммарной РНК, выделенной из лимфоцитов селезенки на начальной стадии торможения постгеморрагической регенерации эритроидной ткани, увеличивается адгезия лимфоидных клеток к ЭО, содержащим в «короне» созревающие эритробласты.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы по теме «Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях» (НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича) и комплексной темы НИР «Регуляция клеточной функции и некроза в эксперименте и клинике», №01201354257 (Южно-Уральский государственный медицинский университет).

Список литературы

1. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. – Москва. Издательство РАМН, 2009.
2. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки крыс на эритропоэз *in vitro*. Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – № 4(12). – С. 35–39.
3. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз в культуре эритробластических островков крыс с полицитемией. Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – № 4(12). – С. 40–43.
4. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. Онкогематология. – 2015. – Т. 10, № 2. – С. 58–62.
5. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О стимулирующих эритропоэз свойствах суммарной РНК лимфоцитов периферической крови при эритремии. Клиническая и экспериментальная морфология. – 2015. – № 1(13). – С. 33–37.
6. Волчегорский И.А., Тишевская Н.В., Кузнецов Д.А. Влияние «средних молекул», выделенных из плазмы крови интактных и обожженных животных, на клеточный состав культур эритробластических островков костного мозга. Вестник Российской академии медицинских наук. – 2002. – № 2. – С. 30–36.
7. Волчегорский И.А., Тишевская Н.В., Дементьева Е.В. Антианемическое действие реамберина в остром периоде аллоксанового диабета у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71, № 6. – С. 23–27.
8. Геворкян Н.М., Бабаева А.Г. Вариативность проявлений морфогенетической функции лимфоцитов в зависимости от характера и локализации повреждения органа. Вестник РАЕН. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 44–47.
9. Захаров Ю.М., Мельников И.Ю., Рассохин А.Г. Классификация эритробластических островков костного мозга с учетом изменения их клеточного состава. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1990. – № 5. – С. 38–42.
10. Захаров Ю.М., Тишевская Н.В. О взаимосвязи функциональной активности макрофагов с кинетикой эритропоэза в эритробластических островках. В сб.: Вопросы экспериментальной физиологии. – Екатеринбург, 1997. – С. 95–103.
11. Захаров Ю.М., Тишевская Н.В. Культура эритробластических островков – новый инструмент для исследования эритропоэза. Вестник Уральского медицинской академической науки. – 2003. – № 1. – С. 65–68.
12. Захаров Ю.М., Тишевская Н.В. Об особенностях ассоциации клеток моноцитарной, эритроидной и гранулоцитарной линий в кровяной ткани. Медицинский академический журнал. – 2003. – Т. 3, № 2. – С. 11–18.
13. Захаров Ю.М., Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Макарова Н.А., Шапошник И.И. Антигипоксические и протекторные свойства эритропоэтина. Медицинская наука и образование Урала. – 2008. – Т. 9, № 2. – С. 40–43.
14. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние гуморальных факторов на фагоцитарную активность центральных макрофагов в культуре эритробластических островков. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2002. – Т. 88, № 9. – С. 1191–1198.
15. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние эритропоэтина и макрофагального колониестимулирующего фактора на пролиферативную активность эритроидных клеток в культурах эритробластических островков. Медицинский академический журнал. – 2003. – Т. 3, № 3. – С. 67–72.
16. Тишевская Н.В. Влияние катехоламинов на эритропоэз в культуре эритробластических островков. Известия Челябинского научного центра УрО РАН. – 2004. – № 5. – С. 97–101.
17. Тишевская Н.В., Болотов А.А., Захаров Ю.М. Математическое моделирование межклеточных взаимодействий в культуре эритробластических островков. Медицинский академический журнал. – 2005. – Т. 5, № 4. – С. 50–59.
18. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Бабаева А.Г., Захаров Ю.М., Козлова Н.И., Болотов А.А. Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 4. – С. 451–461.
19. Тишевской И.А., Захаров Ю.М., Тишевская Н.В. Влияние острой застойной спленоmegалии на состояние эритрона у крыс. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 3. – С. 353–359.