

СИСТЕМА РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Феномен инактивации аллогенных стволовых клеток открыт Петровым и Сеславиной в 1967 г. [9]. Основопологающие эксперименты по исследованию этого феномена проведены с использованием метода культуры *in vivo* и разработанного Till и McCulloch [20] способа количественной оценки стволовых клеток при трансплантации кроветворной ткани летально облученным мышам-реципиентам. Суть феномена инактивации состоит в том, что при совместном введении облученным реципиентам лимфоцитов и несингенных стволовых клеток происходит подавление способности последних образовывать колонии в селезенках. Относящийся к разряду явлений естественной резистентности, защиты, не требующей предварительной сенсибилизации, данный феномен по многим критериям — основной механизм иммунологического надзора, поскольку осуществляет контроль пролиферации стволовых клеток с широким спектром антигенных отклонений как в рамках главного комплекса гистосовместимости, так и вне его [17].

Исследования феномена инактивации показали, что клетками-эффекторами, обеспечивающими необратимую блокаду пролиферации аллогенных стволовых клеток, являются Т-лимфоциты [11], а В-лимфоциты, не обладали инактивирующим действием, они могут оказывать хелперный эффект [5, 6].

Исследования роли количественных соотношений взаимодействующих клеток в данном феномене показали, что эффект действия Т- и В-лимфоцитов на пролиферацию стволовых клеток не однозначен, существенно зависит от их числа и может изменяться на противоположный при варьировании этих соотношений [1, 7, 9]. В связи с этим новое значение приобретает вопрос о роли обсуждаемого феномена в жизнедеятельности организма.

Методика

В экспериментах использовали мышей линии СВА, С57BL/6 и гибриды (СВА×С57BL/6)F₁. Донорами лимфоцитов лимфатических узлов (ЛУ) служили мыши линии СВА, донорами клеток костного мозга — мыши С57BL/6. Клеточные суспензии из этих органов готовили общепринятыми методами. Т- и В-лимфоциты лимфатических узлов разделяли с помощью препаративного клеточного электрофореза в вертикальном градиенте плотности, как описано [8]. Экзогенное колониеобразование оценивали по Till и McCulloch [11] на 8-е сутки после введения мышам-реципиентам клеток костного мозга (0,3 млн на мышь).

Взаимодействие лимфоцитов с аллогенными стволовыми клетками определяли по изменению колониеобразования при введении реципиентам смеси клеток костного мозга и варьированного числа лимфоцитов. Эффекторную функцию Т-лимфоцитов ЛУ характеризовали индексом инактивации

$$I = \frac{S - S_0}{S},$$

где S — среднее число колониеобразующих единиц в контрольной группе при введении клеток костного мозга, S_0 — то же в экспериментальной группе при введении клеток костного мозга в комбинации с лимфоцитами.

В группах было по 10–12 мышей-реципиентов. Регулирующую функцию В-лимфоцитов ЛУ характеризовали коэффициентом регуляции:

$$R = \frac{I' - I}{1 - I},$$

не с наличием гемического, нтов, что в итоге приводит организма.

ON DEVELOPMENT
ORGANISM UNDER ACUTE
LOOD SUBSTITUTION

and acute hemorrhage amounting
ith subsequent replacement of the
died in rats under conditions of
Effect of middle mountains on the
a positive one as the true hypoxic
not practically develop. A pronoun-
tory and hypoxic components de-
haustion of compensatory poten-
крови, о чем свидетельствуют
вотны в крови, в то время
отсутствует (это то же). Иначе
в то же время (а) трансплантат
ности организма и адаптивных
ни к гипоксии // Успехи физиол.
крови, о чем свидетельствуют
объем сердца и его регуляция:

ределение гемоглобина крови по
№ 3.— С. 3.

ука, 1975.—239 с.
рода в тканях мозга при острой
овью // Патол. физиология и эк-

и шоке.— Л.: Медицина, 1984.—

ения гемоглобина.— Л.: Медици-

3 с.

ма, оживляемого после смертель-
асчеты параметров кислородных
каскадов // Кислородный режим
а, 1966.— С. 16—22.

еская гипоксия // Проблемы кос-
остояния и напряжения газов в
ореф. дис. ... канд. биол. наук.—

юцитов на аппарате ФЭК-М //

чна для кровозаминника геосену
изиол. журн. 1974.—20, № 2.—

А. Открытый метод определения
изиол. журн.—1981.—27, № 2.—

and terminology in blood acid-
6, 133, N 1.—P. 59—65.

Поступила 21.01.85

где I — индекс инактивации при введении смеси клеток костного мозга и Т-лимфоцитов; I' — то же при добавлении к указанной смеси В-лимфоцитов.

Статистическую обработку результатов проводили обычными методами с некоторыми дополнениями [2].

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена зависимость индекса инактивации от числа вводимых лимфоцитов ЛУ. Зависимость носит двухфазный характер — стимуляция колониеобразования малым числом лимфоцитов и

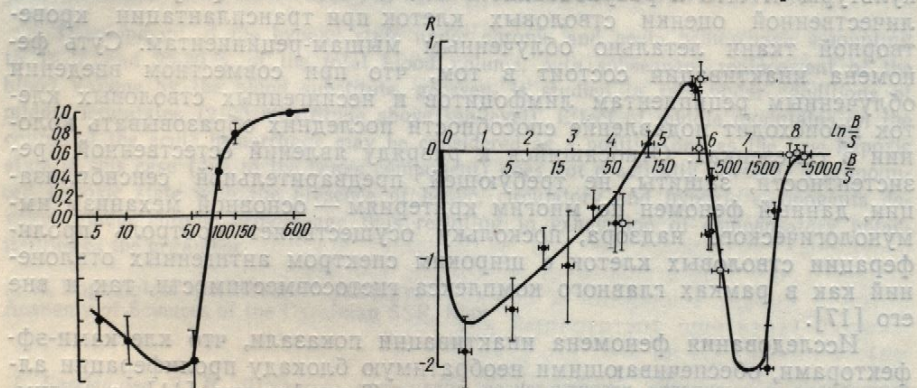


Рис. 1. Зависимость индекса инактивации (ось ординат) от числа (тыс. клеток на мышь) вводимых лимфоцитов ЛУ (ось абсцисс; масштаб логарифмический).

Рис. 2. Зависимость коэффициента регуляции (ось ординат) от отношения числа В-лимфоцитов к среднему числу КОЕс в контрольной группе (ось абсцисс; масштаб логарифмический).

подавление колониеобразования большим. Аналогичные зависимости мы получили при использовании Т-лимфоцитов из различных органов мыши при разнообразных способах очистки и обогащения [1]. Мы установили также, что изменение характера действия Т-лимфоцитов на аллогенные стволовые клетки зависит не от их количественного соотношения со стволовыми клетками, а только от абсолютного числа Т-лимфоцитов. Число Т-лимфоцитов, при котором их стимулирующее действие сменяется на инактивирующее, составляет 80 тыс на мышь (см. рис. 1), мы называем «уровнем нулевой активности».

В серии экспериментов мы исследовали регулируемую функцию В-лимфоцитов в данном феномене. При этом опытным группам мышей-реципиентов вводили вместе с клетками костного мозга разделенные электрофорезом Т- и В-лимфоциты ЛУ в различных количественных сочетаниях. На рис. 2 представлен фрагмент зависимости коэффициента регуляции от соотношения В-лимфоцитов и КОЕс в контрольной группе. При изменении этого соотношения может проявляться супрессорный и хелперный эффекты В-лимфоцитов-регуляторов [5]. При двух относительных значениях чисел В-лимфоцитов (при В/КОЕс-100 и В/КОЕс-500) их регулирующий эффект отсутствует. Назовем их «первым и вторым уровнями нулевого регулирования».

Характер регулирующего действия В-лимфоцитов исследован в отдельном эксперименте, в котором к нарастающему числу Т-лимфоцитов добавляли фиксированное число В-лимфоцитов, т. е. В/КОЕс-50 (действие супрессорное; рис. 3). Результирующее действие В-лимфоцитов нашло отражение в «смещении» графика зависимости индекса инактивации вправо по оси абсцисс.

Как показали наши исследования, мишенью для В-лимфоцитов также являются аллогенные стволовые клетки, а отношение В/КОЕс определяет их регулирующий эффект. Отдельно от Т-лимфоцитов В-лимфоциты видимого эффекта на аллогенные стволовые клетки не

проявляют, что соответствует [3, 6].

В чем смысл эффекта В-лимфоцитов на клетки Т-лимфоцитамности организма? Если инактивирующей, имея надзор за мутационно мулирующего эффекта. Примеры стимуляции клеток-мишеней в ра

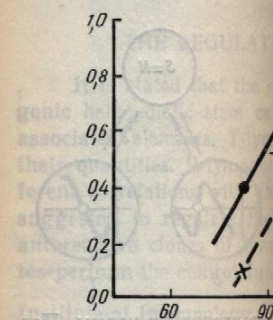


Рис. 3. Зависимость (в частях ординат) от добавления (тыс. клеток на мышь) В-лимфоцитов.

Рис. 4. Контроль размера колоний. Зависимость индекса инактивации от отношения В-лимфоцитов к КОЕс.

что привело к появлению системы, функции которой органов [13, 16, 18]. Отметим, что согласно с животным и человеческими лимфоцитами. В чем смысл эффекта В-лимфоцитов на клетки Т-лимфоцитамности организма? Если инактивирующей, имея надзор за мутационно мулирующего эффекта. Примеры стимуляции клеток-мишеней в ра

В целом можно говорить о контроле пролиферации

463

тивных Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов-регуляторов заданы генетически и соответствуют уровню нулевой активности и нулевого регулирования. При соответствии пула стволовых клеток норме их соотношение с В-лимфоцитами таково, что их регулирующее влияние не проявляется (рис. 4). При отклонении размера пула стволовых клеток от нормы меняется их соотношение с В-лимфоцитами. Те, взаимодействуя со стволовыми клетками, переводят их в форму, доступную для проявления эффекторной функции Т-лимфоцитов. После чего Т-лимфоциты, взаимодействуя со стволовыми клетками, стимулируют или подавляют их

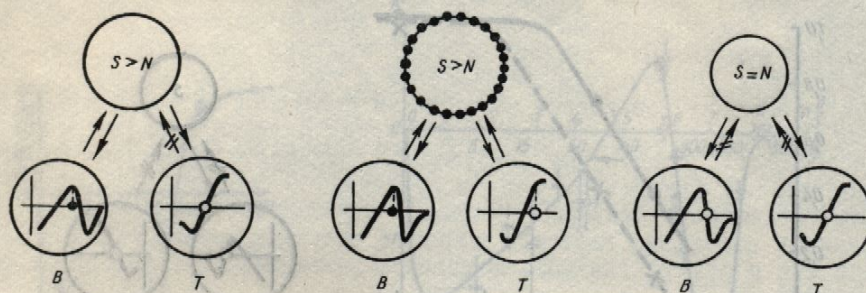


Рис. 5. Контроль и регуляция пула стволовых клеток при превышении их нормы. Первый рисунок — превышение размера пула стволовых клеток нормы вызывает супрессорное действие В-лимфоцитов. Второй рисунок — В-лимфоциты, действуя на стволовые клетки, делают их лабильными к воздействию Т-лимфоцитов. Третий рисунок — действием Т-лимфоцитов размер пула стволовых клеток приведен к норме. Т- и В-лимфоциты находятся в зонах нулевой активности регулирования.

пролиферацию и возвращают размер пула стволовых клеток к норме. Для случая увеличения пула стволовых клеток сверх нормы этот пример регуляции показан на рис. 5.

Таким образом, имеется кибернетическая система регуляции размера пула собственных стволовых клеток организма, в которой контролирующую и управляющую функцию исполняют В-лимфоциты, а эффекторным звеном являются Т-лимфоциты. Если принять предположение, что основная функция этой системы — генетически запрограммированный контроль размера пула стволовых клеток, то иммунологический надзор можно рассматривать как одно из следствий этой функции. Именно поэтому система иммунологического надзора способна при нарушениях клеточных соотношений приводить к парадоксальным проявлениям стимулирующей опухолевой рост активности [19]. Патология иммунной системы при опухолевом росте проявляется, в частности, в значительном поражении предшественников В-клеток, нарушении дифференцировки и их числа [12].

Согласно нашим данным, значительное снижение числа В-клеток может привести к переходу системы в состояние первого уровня нулевого регулирования — состояние неустойчивого равновесия. В этом состоянии увеличение числа клеток-мишеней приведет к проявлению сильного супрессорного эффекта В-лимфоцитов.

В свою очередь супрессия эффекторной функции Т-лимфоцитов приведет к выраженному проявлению их стимулирующего эффекта. Все это наблюдается на практике. Супрессорная активность В-лимфоцитов при опухолевом росте значительно повышается [12]. Т-лимфоциты могут оказывать стимулирующий эффект на рост опухоли [20]. Эти проявления носят на начальных стадиях канцерогенеза локальный характер, сосредоточены в области локализации опухоли и могут быть объяснены ослабленной миграцией Т- и В-лимфоцитов к месту локализации опухоли [12]. Сниженные числа В-лимфоцитов оказывают супрессорный эффект, чем еще больше способствуют проявлению стимулирующей активности сниженного числа Т-лимфоцитов. Таким об-

разом, развитие опухоли ниями количественных с чем, согласно изложен обеспечивающей распол и регуляцию эффекторн

Открытие регулирую их в разряд центральног механизме иммунологичес

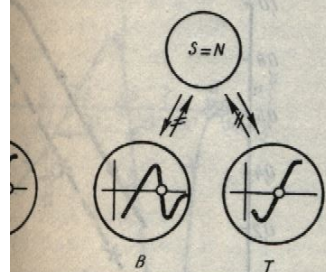
THE REGULATION

It is stated that the effect genic hemopoietic stem cells (associated elements. T-lymphoc their quantities. B-lymphocytes ferent correlations with stem c suggested to regulate the pro autoreactive clones of lymphoc tes-perform the control function

Institute of Immunology, Minist of the USSR

1. Дозморов И. М. Применени гических исследованиях // И
2. Дозморов И. М., Петров Р. вых клеток субпопуляциями ностью // Иммунология. — 1
3. Манько В. М., Халатян Н. логенных стволовых клеток гии. — 1978. — № 11. — С. 81-
4. Петров Р. В. Иммунология.
5. Петров Р. В., Дозморов И. ты биологии развития. — М.
6. Петров Р. В., Дозморов И. реакции инактивации аллог 1983. — № 3. — С. 20—22.
7. Петров Р. В., Дозморов И. честв лимфоцитов на аллог
8. Петров Р. В., Дозморов И. фоцитов, полученных пр № 5. — С. 5—8.
9. Петров Р. В., Сеславина Л. тически несовместимых кле СССР. — 1967. — 176, № 5.—
10. Петров Р. В., Хаитов Р. М. клеток на иммунный ответ генотипам // Там же. — 220.
11. Руднева Т. Б., Халатян Н. способности клеток костного логи, эпидемиологии и имм
12. Хаитов Р. М. Патология н 1979, 8. — С. 92—116.
13. Burch P. B. J., Burwell R. munology // — Quart. Rev. 1
14. Carrel A. Growth promoting P. 385—391.
15. Lambert P. B., Frank H. A. grafts // Science. — 1967. — 1
16. Petranyi G. The other side of the immune system // Act
17. Petrov R. V., Sestlavina L. cells by lymphocytes nonl Proc. — 1977. — 9, N 1. — P. 5
18. Pliskin M. E., Perhn R. T. hiperplasia by passive trans 17, N 5. — P. 290—299.

регуляторов заданы генетическими и нулевого регуляторов клеток норме их соотно- гулирующее влияние не про- вых клеток от нормы меня- Ге, взаимодействуя со ство- доступную для проявления ле чего Т-лимфоциты, вза- мулируют или подавляют их



к при превышении их нормы. Пер- х клеток нормы вызывает супрес- 3-лимфоциты, действуя на стволо- Т-лимфоцитов. Третий рисунок- ток приведен к норме. Т- и В-лим- ноности регулирования.

стволовых клеток к норме. еток сверх нормы этот при- ая система регуляции раз- организма, в которой конт- исполняют В-лимфоциты, а ыты. Если принять предпо- стемы — генетически запро- стоволовых клеток, то имму- ь как одно из следствий иммунологического надзора юшений приводить к пара- опухолевый рост активности опухолевом росте проявляется, предшественников В-клеток,].

снижение числа В-клеток тояние первого уровня ну- явного равновесия. В этом ей приведет к проявлению гов.

й функции Т-лимфоцитов стимулирующего эффекта. орная активность В-лимфо- вышается [12]. Т-лимфо- рект на рост опухоли [20]. х канцерогенеза локальный ации опухоли и могут быть лимфоцитов к месту лока- В-лимфоцитов оказывают способствуют проявлению сти- Т-лимфоцитов. Таким об-

разом, развитие опухоли в организме может быть связано с наруше- ниями количественных соотношений взаимодействующих клеток. При- чем, согласно изложенным представлениям, центральной фигурой, обеспечивающей распознавание опухолевых клеток, а также контроль и регуляцию эффекторного звена являются В-лимфоциты-регуляторы.

Открытие регулирующего действия В-лимфоцитов [10] выдвигает их в разряд центрального элемента в иммунологических реакциях и в механизме иммунологического надзора.

I. M. Dozmozov

THE REGULATION SYSTEM OF STEM CELLS PROLIFERATION

It is stated that the effects of interaction between the mouse lymphocytes and allo- genic hemopoietic stem cells (HSC) are determined by quantitative correlations of the associated elements. T-lymphocytes exert the stimulation-inactivation effect by varying their quantities. B-lymphocytes play the role of regulatory cells and being used in different correlations with stem cells have helper-suppressor action. A cybernetic scheme is suggested to regulate the proliferation of hemopoietic stem cells in the organism by autoreactive clones of lymphocytes, where T-lymphocytes are effectors and B-lymphocytes perform the control function.

Institute of Immunology, Ministry of Public Health of the USSR

1. Дозморов И. М. Применение препаративного клеточного электрофореза в иммуно- логических исследованиях // Иммунология.— 1984.— 13.— С. 166—194.
2. Дозморов И. М., Петров Р. В., Левин А. Д. и др. Инактивация аллогенных стволо- вых клеток субпопуляциями лимфоцитов с различной электрофоретической подвиж- ностью // Иммунология.— 1982.— № 6.— С. 45—48.
3. Манько В. М., Халатян Н. А., Руднева Т. Б. Роль В-лимфоцитов в инактивации ал- логенных стволовых клеток // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиоло- гии.— 1978.— № 11.— С. 81—85.
4. Петров Р. В. Иммунология.— М.: Медицина, 1983.— С. 368.
5. Петров Р. В., Дозморов И. М. В-лимфоциты-регуляторы // Иммунологические аспек- ты биологии развития.— М.: Наука, 1984.— С. 5—14.
6. Петров Р. В., Дозморов И. М., Левин А. Д. и др. Синергизм Т- и В-лимфоцитов в реакции инактивации аллогенных кроветворных стволовых клеток // Иммунология.— 1983.— № 3.— С. 20—22.
7. Петров Р. В., Дозморов И. М., Левин А. Д. Стимулирующее влияние малых коли- честв лимфоцитов на аллогенные стволовые клетки // Там же.— № 2.— С. 42—43.
8. Петров Р. В., Дозморов И. М., Левин А. Д. и др. Характеристика субпопуляций лим- фоцитов, полученных препаративным электрофорезом // Иммунология.— 1980.— № 5.— С. 5—8.
9. Петров Р. В., Сеславина Л. С. Инактивация «стволовых клеток» при контакте гене- тически несовместимых клеточных взвесей из лимфодных тканей // Докл. АН СССР.— 1967.— 176, № 5.— С. 1170—1173.
10. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Батырбеков А. А. Супрессивное действие сингенных В- клеток на иммунный ответ у мышей, относящихся к высоко или низко реагирующим генотипам // Там же.— 220, № 6.— С. 1446—1448.
11. Руднева Т. Б., Халатян Н. А., Манько В. М. Инактивация колониеобразующей спо- собности клеток костного мозга аллогенными Т-лимфоцитами // Журн. микробио- логии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 1978.— № 3.— С. 84—87.
12. Хаитов Р. М. Патология иммунной системы при опухолевом росте // Иммунология, 1979, 8.— С. 92—116.
13. Burch P. B. J., Burwell R. G. Self and nonself. A clonal induction approach to im- munology // — Quart. Rev. Biol.— 1965.— 40.— P. 252—279.
14. Carrel A. Growth promoting function of leukocytes // J. Exp. Med.— 1922.— 36, N 3.— P. 385—391.
15. Lambert P. B., Frank H. A. Local recognition of histocompatibility differences in skin grafts // Science.— 1967.— 155, N 3785.— P. 99—101.
16. Petranyi G. The other side of immunology: immunoplasia trophis (plastic) function of the immune system // Acta med. Hung.— 1983.— 40, N 2/3.— P. 83—74.
17. Petrov R. V., Sestavina L. S., Panteleev E. I., Yegorova O. S. Inactivation of stem cells by lymphocytes nonlinked to the H-2 histocompatibility system // Transpl. Proc.— 1977.— 9, N 1.— P. 555—557.
18. Pliskin M. E., Perhn R. T. Stimulation of livor regeration and compensatory kidney hiperplasia by passive transfer of spleen cells // J. Reticuloen dothel. Soc.— 1975.— 17, N 5.— P. 290—299.

19. Prehn R. T. The immune reaction as stimulation of tumor growth // Science.—1972.—176, N 4031.—P. 170—171.
20. Till J. E. McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat. Res.—1961.—14, N 2.—P. 213—222.
21. Wilson D. B. Quantitative studies on the behavior of sensitized lymphocytes in vitro. I. Relationship of destruction of homologous target cells to number of lymphocytes and to the time of contact in culture and consideration of isoimmune serum // J. Exp. Med.—1965.—122, N 1.—P. 143—166.

Ин-т иммунологии МЗ СССР

Поступила 06.12.85

УДК 611—018.2.428.438:616.451—089.87

К. П. Зак, М. Л. Винницкая

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛЭКТОМИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ЛИМФОИДНЫХ И СТРОМАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ТИМУСА

Последнее десятилетие характеризовалось интенсивным изучением роли вилочковой железы в физиологических и патологических процессах. Были получены неоспоримые доказательства огромного значения тимуса в иммунных реакциях гомеостаза. Показано, что тимус — не только центральный орган лимфоидной системы, генерализующий иммунокомпетентные клетки, но и важная эндокринная железа, регулирующая внутри- и внетимическую дифференцировку Т-клеток и некоторые другие физиологические функции [12]. На субмикроскопическом уровне было выявлено значительное разнообразие структуры лимфоидных и особенно стромальных элементов тимуса, которые составляют микроокружение и отвечают за секрецию гормональных факторов. Было установлено, что различные виды лимфоидных и стромальных клеток эпителиального и мезенхимального происхождения, экспрессирующих неодинаковые наборы мембранных антигенов, находятся в сложных морфологических и функциональных взаимоотношениях, образуя клеточные ассоциации — «клетки-няньки», макрофагальные розетки и др. [9, 11, 13].

Известно, что в организме человека и животных тимус находится в тесной взаимосвязи с другими железами внутренней секреции, прежде всего с корой надпочечников. Инволюция тимуса — один из наиболее характерных признаков гиперкортицизма [2, 7]. С другой стороны, значительное увеличение массы вилочковой железы наблюдается после адреналэктомии [1, 4, 5]. Однако механизм взаимодействия этих двух желез в иммунном гомеостазе во многом остается еще неясным. Полученные в последние годы данные о структуре и функции различных видов тимоцитов и особенно клеток, составляющих микроокружение, позволяют рассмотреть этот вопрос с новых позиций. Цель настоящей работы — субмикроскопическое изучение лимфоидных и стромальных элементов тимуса мышей при недостатке кортикостероидов.

Методика

Исследования проведены на 35 мышках-самцах линии СВА, массой 18—20 г. Двустороннюю адреналэктомию проводили под эфирным наркозом по общепринятой методике. После операции мышам давали для питья 1 %-ный раствор хлористого натрия.

Изучение ультраструктуры клеток тимуса проводили через 7, 14 и 21 сут после адреналэктомии. Животных декапитировали, вилочковую железу отделяли от прилегающих тканей, взвешивали на торсионных весах и измельчали. Кусочки органа фиксировали в 2,5 %-ном растворе глутаральдегида (фирма «Merck»), приготовленном на фосфатном сбалансированном буфере (концентрация 0,1 моль/л, рН 7,3), постфиксировали в 1 %-ном растворе осмия, приготовленном на том же буфере, обезвоживали в спиртах восходящей крепости и в абсолютном ацетоне, затем заключали в аралдит (фирма

«Schuchart»). Срезы, изготовленные из уранилацетата и цитратом JEM-100C (фирма «JEOL»).

Через 7 и 14 сут после операции

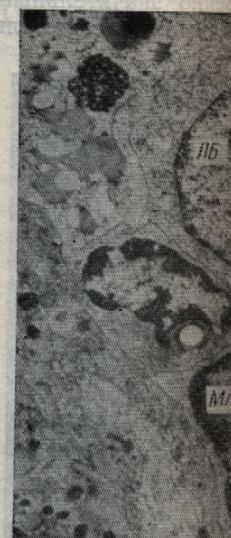


Рис. 1. Фрагмент суб

ЛБ — лимфобласт, МЛ — м

$P < 0,01$), через 14 сут — $P < 0,01$), у контрольных соответственно.

Лимфоидные клетки. Лимфоидные клетки при адреналэктомии у мышей (печень) наблюдалось расширение коры тимуса. Распологались более в следовании субкапсулярных числах лимфобластов, ми с четко выраженным большим числом свободным эндоплазматическим ретикулом (рис. 1). Возрастающее число пикнотических ядер с новыми ядрами отмечалось целлюлярно в гигантских клетках, называемых «клетками-няньками».

В мозговом слое желтого вещества тимуса заметно повышено. Увеличение от субкапсулярного слоя цитоплазмы, в котором электроносветлых набухших элементов.

Через 21 сут после операции к нормализации состава и объясняется быстрым во всех этих видов животных в