

ПОПУГАЙЛО
Михаил
Владимирович

*Доцент кафедры патологической
физиологии УГМА, кандидат
медицинских наук, доцент*

ПРОБЛЕМА ЛИМФОИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОПОЭЗА ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ

В начале 1974 года Анатолий Петрович Ястребов, только что ставший заведующим кафедрой патологической физиологии Свердловского государственного медицинского института, предложил мне заняться разработкой совершенно не изученных в то время вопросов участия лимфоидной системы в регуляции гемопоэза при экстремальных воздействиях на организм. Развитие этого направления было весьма перспективно, поскольку к этому времени уже имелись публикации Бабаевой А.Г., показавшей возможность переноса «регенераторной» информации с помощью лимфоцитов от частично гепатэктомированных доноров интактным реципиентам, а также работы Петрова Р.В., Швеца В.Н. и других, показавших возможность взаимодействия лимфоидных клеток со стволовыми кроветворными клетками.

В наших первых экспериментах изучалась роль лимфоидной системы в регенерации крови в условиях кровопотери путем трансплантации лимфоцитов анемизированных доноров интактным реципиентам. Однако получить желаемые результаты на данной модели не удалось. У реципиентов лимфоцитов развивались признаки реакции отторжения трансплантата, которые нивелировали реакцию системы гемопоэза. Неудача в опытах была связана с тем, что они проводились на белых беспородных крысах. И только после того, как появилась возможность работать на линейных животных, были получены первые результаты, подтверждающие справедливость научной гипотезы Ястребова А.П. В результате проведенных исследований была установлена способность лимфоидных клеток живот-

*Проблема лимфоидной регуляции гемопоэза
при экстремальных воздействиях на организм*

ных, подвергавшихся воздействию экстремальных факторов, индуцирующих последующую активацию эритропоэза, стимулировать эритропоэз у интактных и облученных реципиентов. В дальнейшем научные идеи, сформулированные в данной работе, послужили толчком для начала и успешного проведения научных исследований другими учениками академика Ястребова А.П. Вспоминая годы активной научной работы, я должен сказать, что успех ее был предопределен не столько материальным или методическим обеспечением исследований, сколько тем вниманием, заинтересованностью, дружеской поддержкой и конструктивной требовательностью, которые проявлял ко мне и проводимым мною исследованиям Анатолий Петрович Ястребов, за что я ему искренне благодарен.

Система гемопоэза является одной из основных функциональных систем организма, от состояния которой в существенной мере зависит его гомеостаз. В связи с этим изучение механизмов регуляции в системе кроветворения приобретает особую актуальность. Между тем именно эта сторона проблемы является наиболее противоречивой. За последнее время многие старые представления о регуляторных механизмах в системе крови претерпели существенный пересмотр, а новые концепции, стимулом для выдвижения которых послужило изучение реакций класса стволовых кроветворных клеток, достаточно гипотетичны и подчас не дают определенного выхода для решения проблем клинической и экспериментальной гематологии. Еще больше нерешенных вопросов в проблеме регенерации крови возникает в связи с изучением ее особенностей в условиях действия на организм экстремальных факторов, контакт с которыми современного человека постоянно увеличивается.

Среди факторов, участвующих в регуляции регенераторных процессов, важное место занимает лимфоидная система. Так, было установлено, что лимфоидные клетки участвуют в стимуляции регенераторных процессов в печени, почке, сердечной мышце после предшествующей экстирпации части органа или его повреждения [2—12, 31, 32, 39, 42, 64]. Интенсивность регенераторных процессов в условиях дефицита лимфоидных клеток значительно снижается [37, 40, 41, 54, 55].

Что касается участия лимфатических клеток в процессах регенерации крови при действии на организм экстремальных факторов, то

таких исследований не проводилось. Между тем, принимая во внимание большую реактивность этой системы, определенную связь со стволовыми кроветворными клетками, участие в иммунологических процессах, также имеющих существенное значение при регенерации, роль лимфоидных клеток в механизмах регуляции гемопоэза представляется весьма вероятной. Данные о взаимодействии лимфоидных клеток с кроветворной тканью лишь только предполагают такую роль [35, 36, 49], оставляя открытым вопрос для условий действия на организм экстремальных факторов.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все вышеизложенное и определило основную цель нашего исследования, которая заключалась в изучении способности лимфоидных клеток участвовать в регуляции гемопоэза при воздействии на организм экстремальных факторов. На этом основании были определены следующие задачи исследования:

1. Исследовать способность лимфоидных клеток животных-доноров, подвергавшихся воздействию экстремальных факторов, влиять на гемопоэз интактных реципиентов.
2. Дать количественную оценку эритропоэзстимулирующих свойств лимфоидных клеток доноров, подвергавшихся гипоксическим воздействиям.
3. Исследовать изменение содержания нуклеиновых кислот в клетках кроветворных органов экспериментальных животных после трансплантации им лимфоидных клеток доноров, подвергавшихся гипоксическим воздействиям.
4. Исследовать особенности гемопоэза у животных с дефицитом лимфоидных клеток при действии на них хронической гипоксии.
5. Изучить влияние трансплантируемых лимфоидных клеток на содержание стволовых кроветворных клеток в органах кроветворения реципиентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения роли лимфоцитов в регуляции эритропоэза использовался перенос лимфоцитов доноров, подвергавшихся действию стимулирующих эритропоэз факторов, в организм интактных или облущен-

ных реципиентов, у которых в течение 3—9 суток после трансплантации определялись различные показатели гемопоэза. Эксперименты были проведены на 441 крысе (белых беспородных и линий Вистар), 534 мышах (белых беспородных, линии СВА и BALB/с) и 6 кроликах.

Лимфоидные клетки для трансплантации реципиентам получали от доноров через 4 или 16—18 часов после одной инъекции 3 мл/кг кобальта, или через 24 часа после трех ежедневных инъекций кобальта; после 1-часового или 6-часового пребывания в условиях гипоксической гипоксии (в барокамере на «высоте» 7000 м), или после 6-дневного пребывания по 6 часов на 7000 м; через 24 часа после введения 0,6 мл/кг 2,5% раствора фенилгидразина. Указанные дозы вводимых веществ, а также сроки получения лимфоцитов были выбраны в связи с особенностями выработки гуморальных стимуляторов после таких воздействий, а также с целью получить разную степень стимуляции гемопоэза у доноров [45, 50, 58 — 61].

Суспензия клеток селезенки или тимуса готовилась на холоде в среде 199 и дважды отмывалась. Число жизнеспособных клеток определялось с помощью окраски клеток 0,1% раствором трипанового синего [65]. Взвеси селезенки и тимуса трансплантировались реципиентам при наличии не менее 95% жизнеспособных клеток. Реципиентам-крысам суспензия лимфоцитов вводилась внутривенно по $400 \cdot 10^6$ клеток, реципиентам-мышам — по $40 \cdot 10^6$ клеток («рабочая» доза). Способ введения в опытной и контрольной группах был всегда одинаков.

Для изучения влияния разрушенных лимфоцитов на гемопоэз реципиентов клетки разрушали осмотическим цитолизом, суспензируя их в стерильной дистиллированной воде (на 1 мл приходилось $400 \cdot 10^6$ клеток).

У животных-реципиентов определялись следующие гематологические показатели: в периферической крови подсчитывалось число эритроцитов, лейкоцитов, ретикулоцитов, количество гемоглобина, определялась лейкоцитарная формула [30]. В костном мозге, помимо миелограммы, определялось лейко-эритробластическое отношение, митотический индекс пролиферирующих клеток различных линий, общее количество ядросодержащих клеток в одной бедренной кости [62]. При подсчете миелограммы пользовались номенклатурой клеток, соответствующей современной схеме кроветворения [47]. У мышей-реципиентов, кроме того, исследовалось кроветворение в

селезенке: подсчитывалась спленогамма и определялось общее число кариоцитов во всей селезенке.

Пул стволовых кроветворных клеток гемопоэтических органов мышей-реципиентов (линии СВА) изучался методом экзогенного колониеобразования в селезенках летально облученных мышей [66]. Число КОЕ рассчитывалось на количество трансплантированных клеток и на общее количество кариоцитов в костном мозгу или селезенке. Кроме того, исследовалась морфология микроколоний на серийных гистологических срезах селезенки облученных мышей [48].

Изучение эритропоэтического эффекта различных доз вводимых лимфоцитов проводилось путем сравнения их действия на реципиентов (гипоксических полицитемических мышей) с эритропоэтической активностью стандарта «С» эритропоэтина [29]. Предварительно нами была получена доз-реакционная кривая для стандарта «С» эритропоэтина, любезно предоставленного нам заведующим патофизиологической лабораторией ЦОЛИПК академиком Н.А. Федоровым. Эритропоэтическая активность оценивалась по изменению числа ретикулоцитов в периферической крови реципиентов.

В клетках костного мозга и селезенки животных-реципиентов определялось содержание нуклеиновых кислот цитохимическими методами: ДНК выявлялась методом Фелгена [57], РНК — галлоцианинхромовыми квасцами по методу Einarson [56]. Для количественной оценки этих реакций использовался фотографический вариант одноволновой сканирующей цитофотометрии [1, 14, 21, 52]. Этим методом было исследовано около 4500 клеток. Полученные данные подвергались вариационно-статистической обработке по специально разработанной программе на ЭВМ «Мир-2». На основании определения ДНК в ядрах клеток цитофотометрическим методом нами проводился расчет временных параметров жизненного цикла кроветворных клеток [38].

Интенсивность синтеза ДНК в клетках костного мозга и селезенки животных-реципиентов (по включению ^3H -тимидина) изучалась методом автордиографии [20, 25]. Для каждой группы животных рассчитывался индекс меченых клеток (%) и абсолютное число меченых клеток каждой линии. Кроме того, методом автордиографии исследовалась способность к миграции в различные органы лимфоцитов, меченых *in vitro* ^3H -тимидином, после трансплантации их реципиентам.

Определение дыхания и окисленного фосфорилирования клеток кроветворной ткани проводилось с помощью полярографического метода [28, 53].

В специальных экспериментах исследовалось кроветворение (показатели периферической крови и костного мозга) у животных с ингибированным лимфопоэзом при действии на них хронической гипоксической гипоксии. Ингибция лимфопоэза осуществлялась антилимфоцитарной (АЛС) или антитимоцитарной (АТС) сыворотками [27, 67].

Результаты исследований были подвергнуты статистической обработке [33, 44].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

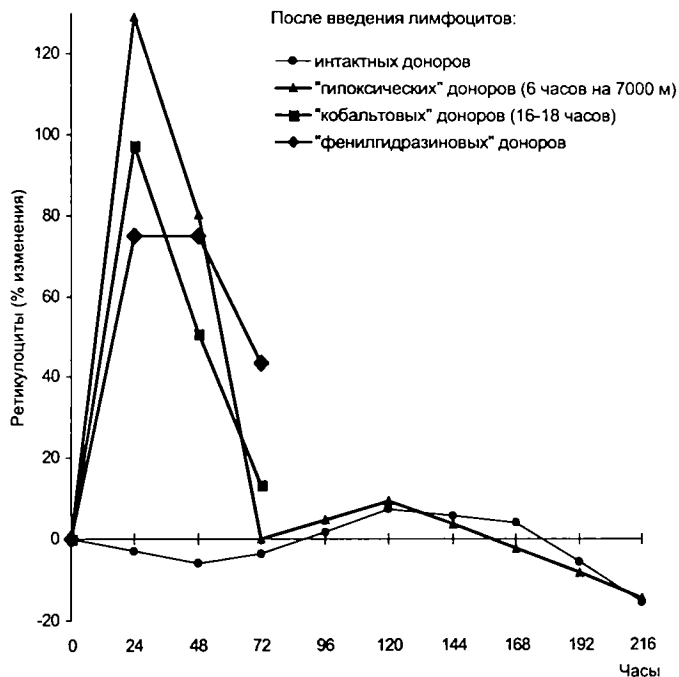
Исследование роли лимфоидных клеток в механизмах регенерации крови при воздействии на организм гипоксической гипоксии. На основании проведенных исследований было установлено, что в результате гипоксического воздействия на организм лимфоидные клетки приобретают способность стимулировать эритропоэз. Так, в опытах на крысах введение $400 \cdot 10^6$ лимфоцитов селезенки, полученных от доноров, подвергавшихся 6-часовому пребыванию на «высоте» 7000 метров, интактным реципиентам вызывало у последних ощутимую стимуляцию эритропоэза. У реципиентов регистрировалось увеличение числа ретикулоцитов через 24 часа (на $129,0 \pm 11,48\%$) (рис. 1) и в последующем увеличение числа эритроцитов (на пятые сутки исследования — на $10,3 \pm \pm 5,45\%$) и содержания гемоглобина в периферической крови (на пятые сутки — на $12,8 \pm 4,00\%$). Об истинном характере стимуляции эритропоэза свидетельствовало гиперплазия эритроидного ростка костного мозга (табл. 1), а также селезенки в опытах на мышах. Кроме того, в эритроидных клетках усиливались под влиянием «гипоксических» лимфоцитов синтетические процессы, сопровождающиеся изменением репродуктивного аппарата кроветворных клеток, о чем свидетельствовало усиление включения ^3H -тимидина (по сравнению с контролем более чем в 1,5 раза) и увеличение содержания РНК в цитоплазме (по сравнению с контролем в 1,3 — 1,7 раза).

Данный феномен воспроизводился как на несингенных (белых крысах и мышах) животных, так и при использовании сингенных доноров и реципиентов (мышь линии СВА и BALB/с), причем в сингенной ситуации стимуляция эритропоэза была выражена более значительно. Если в опытах на несингенных животных подъем числа ретикулоцитов в периферической крови реципиентов регистрировался через 24 часа после трансплантации лимфоцитов «гипоксических» доноров, и к третьим суткам этот показатель снижался до исходного уровня (а в ряде опытов даже был ниже него), то в экспериментах на линейных животных трансплантируемые лимфоидные клетки вызывали увеличение содержания ретикулоцитов в крови реципиентов в течение всех трех дней исследования на постоянно высоком уровне (на $104,4 \pm 23,65\%$ через 24 часа, на $102,85 \pm 19,00\%$ через 48 часов, на $75,5 \pm 13,91\%$ через 72 часа), а увеличение содержания эритроцитов происходило на третьи сутки (на $25,4 \pm 2,70\%$, $P < 0,001$). Стимуляцию эритропоэза в этих экспериментах подтверждают данные миелограмм и спленограмм реципиентов (содержание эритроидных клеток в костном мозге увеличилось в 1,5 раза, в селезенке — 1,7 раза по сравнению с контролем).

После трансплантации лимфоидных клеток селезенки контрольных, «гипоксических» и «кобальтовых» доноров облученным реципиентам у последних наблюдалось более интенсивное восстановление костномозгового кроветворения (число миелокариоцитов увеличилось в 3,4 — 8,6 раза по сравнению с контролем облучения — животными, которым лимфоциты не вводились). Причем после введения «гипоксических» и «кобальтовых» лимфоидных клеток быстрее шло восстановление эритроидных элементов. Число эритроидных клеток в костном мозге увеличилось с $8,72 \pm 1,01\%$ в контроле до $16,77 \pm 1,40\%$, $P < 0,001$ в опыте (эксперименты с трансплантацией «гипоксических» лимфоцитов).

Лимфоциты интактных доноров не оказывали какого-либо существенного влияния на эритропоэз реципиентов, а эритропоэз-стимулирующие свойства трансплантируемых «гипоксических» лимфоцитов в значительной степени зависели от продолжительности гипоксического воздействия, которому подвергались доноры. Одночасовая гипоксия не индуцировала в лимфоцитах эритропоэзстимулирующих свойств, в то время как после более продолжительного воздействия гипоксической гипоксии на организм животного (6-часового и хронического —

*Проблема лимфоидной регуляции гемопоэза
при экстремальных воздействиях на организм*



*Рис. 1. Изменение числа ретикулоцитов в периферической
крови крыс-реципиентов после введения лимфоцитов доноров*

6 дней по 6 часов) лимфоциты заметно активировали эритропоэз у реципиентов. Вероятно, что в процессе такого воздействия лимфоциты приобретали эти свойства не сразу после начала действия экстремального фактора. Стимуляцию эритропоэза вызывали только жизнеспособные клетки: лимфоциты, разрушенные осмотическим цитолизом, подобного действия не оказывали.

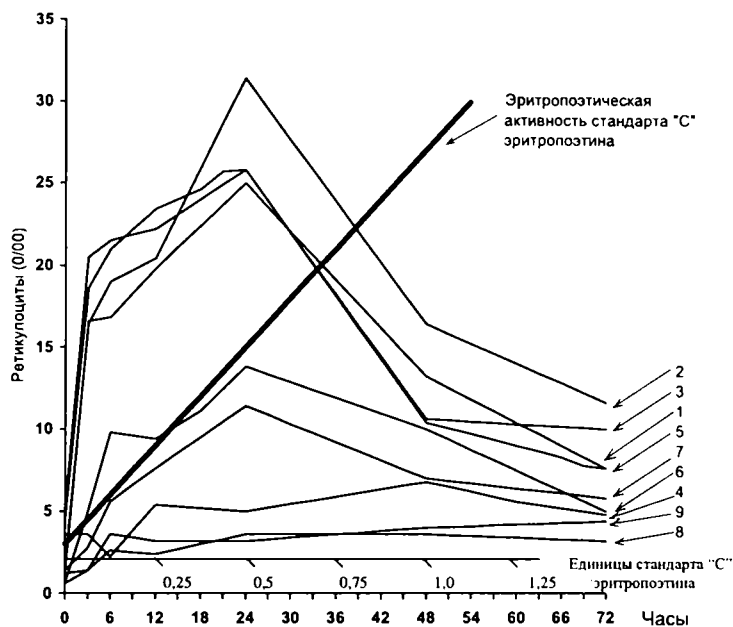
На величину стимулирующего эритропоэз эффекта существенное влияние оказывало количество вводимых «гипоксических» лимфоцитов, хотя и не обнаруживалось истинной линейной зависимости эритропоэтического эффекта от числа вводимых клеток. В наших экспериментах для получения выраженной стимуляции эритропоэза (у мышей) необходимо было трансплантировать от $20 \cdot 10^6$ до $160 \cdot 10^6$ лимфоцитов, что соответствует стимуляции, вызываемой 1,0 — 1,3 единицы стандарта «С» эритропоэтина (рис. 2).

Стимулирующее влияние «гипоксических» лимфоцитов опосредуется через процессы клеточной кооперации со стволовыми кроветворными клетками, в результате которого помимо усиления процессов клеточной пролиферации (табл. 2) (о чем свидетельствует усиление в эритроидных клетках после трансплантации лимфоцитов пластических и синтетических процессов) изменяется и направление дифференцировки стволовых кроветворных клеток. Стволовые кроветворные клетки под влиянием «гипоксических» лимфоцитов в большей степени дифференцируются в эритроидном направлении, чем в обычных условиях, что проявляется в преимущественном росте эритроидных колоний в селезенках летально облученных мышей. Полученные данные в известной мере согласуются с результатами исследований сотрудником лаборатории академика Р.В. Петрова [35, 36, 49], которыми было показано изменение направления дифференцировки стволовых кроветворных клеток в миелоидном направлении при взаимодействии их с лимфоцитами в условиях антигенной стимуляции.

В наших экспериментах установлено, что стволовые кроветворные клетки усиливали пролиферацию и изменяли направление своей дифференцировки не только под влиянием смеси различных видов лимфоидных клеток (Т- и В-клеток и других элементов селезенки), но и в результате действия достаточно чистой популяции Т-клеток (взвеси лимфоцитов тимуса) (табл. 2).

Полученные результаты дают основание для предположения о том, что это явление происходит не только в условиях трансплантации,

Проблема лимфоидной регуляции гемопоэза
при экстремальных воздействиях на организм



Количество вводимых лимфоцитов «гипоксических» доноров:

- | | |
|--|----------------------|
| 1 – 160×10^6 | 5 – 20×10^6 |
| 2 – 80×10^6 | 6 – 10×10^6 |
| 3 – 40×10^6 | 7 – 1×10^6 |
| 4 – 40×10^6 (интактных доноров) | 8 – 1×10^5 |
| | 9 – 1×10^4 |

Рис. 2. Зависимость эритропоэстимулирующего эффекта у мышей-реципиентов от количества вводимых лимфоцитов «гипоксических» доноров (6 ч на 7000 м)

Таблица 1

**Миелограмма (в %) крыс-реципиентов через 72 часа
после трансплантации лимфоцитов доноров ($M \pm m$)**

Миелограмма (в %)	После трансплантации лимфоцитов						
	Интактных доноров	«Гипоксичес- ких» доноров	P	«Кобальтовых» доноров	P	«Фенилгидра- зиновых» доноров	P
	n = 13	n = 7		n = 12		n = 7	
Миелоидные клетки	53,40±2,42	46,26±1,53	< 0,03	44,46±2,02	< 0,011	41,82±3,22	< 0,014
Лимфоидные клетки	19,90±2,41	9,32±0,99	< 0,001	13,21±2,34	< 0,06	15,78±2,39	< 0,50
Моноциты	1,19±0,17	1,57±0,19	< 0,50	1,02±0,14	< 0,50	0,68±0,07	< 0,02
Плазматические клетки	1,50±0,19	2,61±0,33	< 0,01	2,50±0,41	< 0,04	2,36±0,50	< 0,50
Ретикулярные клетки	1,04±0,18	2,75±0,80	< 0,06	1,19±0,14	< 0,50	1,39±0,38	< 0,50
Недифференцирован- ные бласты	1,60±0,37	1,18±0,28	< 0,50	0,92±0,16	< 0,12	2,21±0,46	< 0,50
Эритробласты	0,85±0,14	1,14±0,16	< 0,50	1,50±0,25	< 0,04	1,07±0,27	< 0,50
Пронормоциты	1,52±0,13	3,93±0,33	< 0,001	3,04±0,30	< 0,001	2,61±0,25	< 0,001
Нормоциты базо- фильные	14,69±1,06	27,36±1,42	< 0,001	24,92±1,23	< 0,001	26,86±1,65	< 0,001
Нормоциты полихро- матофильные	4,35±0,90	2,75±0,69	< 0,50	6,63±0,95	< 0,10	4,43±0,91	< 0,50
Нормоциты орто- хромные	0,85±0,26	1,21±0,38	< 0,50	0,90±0,16	< 0,50	0,78±0,20	< 0,50
Весь эритроидный ряд	22,25±1,15	36,39±1,90	< 0,001	36,98±2,18	< 0,001	35,75±1,39	< 0,001

*Проблема лимфоидной регуляции гемопоэза
при экстремальных воздействиях на организм*

но, возможно, оно играет важную роль в механизмах регуляции гемопоэза при воздействии на организм возмущающих эритропоэз факторов. Данные о миграции лимфоцитов в костный мозг с последующим увеличением в нем числа КОЕ в условиях стресса [15 — 17, 22 — 24, 46] делают такое предположение весьма вероятным. Выполненные нами эксперименты с введением реципиентам меченых ^3H -тимидином лимфоцитов «гипоксических» и интактных доноров показали преимущественную миграцию их в кроветворные органы. С другой стороны, у животных (крыс), у которых с помощью АЛС и АТС снижали содержание лимфоидных клеток, в значительно меньшей мере усиливался эритропоэз в ответ на действие хронической гипоксии.

Таблица 2

**Число КОЕ_с в костном мозге (на 10^5 кариоцитов)
мышей-реципиентов (СВА) после трансплантации
лимфоцитов доноров ($M \pm m$)**

Трансплан- тировались лимфоциты	Число КОЕ _с в костном мозге реципиентов					
	Через 24 часа после трансплантации				Через 72 часа после трансплан- тации спленоцитов доноров	Р
	Спленоцитов доноров	Р	Тимоцитов доноров	Р		
Интактных доноров п	$4,7 \pm 0,85$ 10		$7,75 \pm 1,69$ 16		$2,8 \pm 0,40$ 5	
«Гипоксических» доноров (6 ч. на 7000 м) п	$15,0 \pm 1,92$ 10	$<0,001$	$15,1 \pm 1,41$ 14	$<0,003$	$18,4 \pm 6,80$ 5	$<0,05$
«Кобальтовых» доноров (16-18 часов) п	$7,5 \pm 0,88$ 10	$<0,04$				

Изучение роли лимфоидных клеток в механизмах регенерации крови при гистотоксической и гемолитической гипоксиях. Лимфоциты, полученные от «кобальтовых» доноров, так же как и

лимфоидные клетки «гипоксических» доноров, оказывали стимулирующее влияние на эритропоэз реципиентов. У реципиентов, получавших такие лимфоциты, увеличилось число ретикулоцитов (через 24 часа после трансплантации — на $97,3 \pm 20,54\%$) (рис. 1), эритроцитов, росло количество гемоглобина в периферической крови. В костном мозге наблюдалась гиперплазия ростка эритроидных клеток (табл. 1). После трансплантации «кобальтовых» лимфоцитов у реципиентов изменялись некоторые кинетические характеристики эритроидных клеток; увеличивалась их митотическая активность более чем в 1,5 раза по сравнению с контролем; укорачивалась продолжительность жизненного цикла на 50,4% по сравнению с контролем (в основном за счет пресинтетического и синтетического периодов). Наряду с этим, на стимуляцию физиологической активности кроветворных клеток указывало также повышение окислительного метаболизма клеток костного мозга и увеличение содержания ДНК и РНК в эритроидных элементах кроветворной ткани (табл. 3).

На основании изменения числа морфологически идентифицируемых кроветворных клеток и ряда параметров их жизненного цикла можно считать, что введение лимфоидных клеток «кобальтовых» доноров сопровождается интенсификацией эритропоэза у реципиентов, реализующейся на уровне детерминированных кроветворных клеток. Между тем важной стороной механизма стимулирующего действия «кобальтовых» лимфоцитов на эритропоэз является влияние их на класс недифференцированных гемопоэтических элементов.

Возможно, что в условиях гистотоксической гипоксии, вызванной введением животным кобальта, в лимфоидных клетках формируется способность к миграции в органы кроветворения, сопровождающаяся кооперацией со стволовых клеток (табл. 2), изменяется направление их дифференцировки в сторону эритропоэзочувствительной клетки. Зависимость эритропоэзстимулирующего эффекта при введении кобальта от объема и функционального состояния лимфоидной системы продемонстрирована в исследованиях Berwald et. al. [51], Orten [63].

Наиболее значительные эритропоэзстимулирующие свойства «кобальтовые» лимфоциты приобретали, как и «гипоксические», не сразу, а спустя 16-18 часов после введения кобальта донорам, т.е. в тот период, когда регистрируется наиболее высокая выработка эритропоэтина. В этой связи необходимо отметить результаты исследования П.Д. Горизонтова с соавт. [18], которым было установлено, что вве-

Таблица 3

**Содержание (в условных единицах) нуклеиновых кислот
в эритроидных клетках костного мозга крыс-реципиентов
через 72 часа после трансплантации лимфоцитов доноров.
Цитофотометрическое исследование ($M \pm m$)**

После трансплантации лимфоцитов	РНК в цитоплазме	P	Суммарно РНК и ДНК в ядре	P	ДНК в ядре	P
Контрольных доноров (Физ. р-р)	0,49±0,05		2,24±0,11		2,03±0,10	
«Кобальтовых» доноров, полученных: через 4 часа после инъекции Co++	0,63±0,13	<0,50	3,04±0,24	<0,003	1,67±0,17	<0,07
через 16-18 часов после инъекции Co++	0,49±0,08	>0,50	3,26±0,25	<0,001	2,60±0,19	<0,009
через 24 часа после 3-х инъекций Co++	0,53±0,13	>0,50	3,05±0,29	<0,012	1,96±0,13	>0,50

дение эритропоэтина сопровождается миграцией лимфоидных клеток в органы кроветворения. Возможно, что индукция эритропоэстимулирующих свойств у лимфоцитов связана с влиянием на них эритропоэтина. Принимая также во внимание, что при введении кобальта усиливаются процессы эритродиереза [34, 43], можно предполагать, что эритропоэстимулирующие свойства у лимфоцитов в этих условиях могут индуцироваться вследствие воздействия на них эритропоэтически активных продуктов распада эритроцитов.

Эритропоэстимулирующие свойства лимфоидные клетки приобретали также и в условиях анемической гипоксии (рис. 1; табл. 1). В исследованиях, проведенных с использованием лимфоидных клеток «фенилгидразиновых» животных, было показано, что такими свойствами лимфоидные клетки стали обладать через 24 часа после инъекции фенилгидразина, когда регистрируется значительное увеличение обра-

зования эритропоэтина. Вероятно, что как в процессах кооперации с кроветворными клетками, так и в передаче эритропоэстимулирующих свойств более существенное значение принадлежит Т-лимфоцитам. В опытах с трансплантацией взвеси клеток тимуса, не содержащей В-лимфоцитов, была зарегистрирована более значительная активация эритропоэза у реципиентов. Увеличение числа ретикулоцитов в периферической крови реципиентов, получавших тимоциты, было больше, чем у реципиентов, получавших спленоциты, на 12,4% в первые сутки исследования, на 7,4% — во вторые, на 30,4% — в третьи.

Действие на гемопоэз реципиентов трансплантируемых «гипоксических», «кобальтовых» и «фенилгидразиновых» лимфоцитов было в достаточно высокой степени специфическим. Кроме стимуляции эритропоэза после введения таких лимфоидных клеток не обнаруживалось существенных и стабильных изменений со стороны других ростков кроветворения. Можно лишь отметить стимуляцию лимфопоэза как после введения жизнеспособных лимфоидных клеток, так и при введении продуктов их распада. При этом подобный эффект отмечался и при введении лимфоцитов интактных животных. В этой связи следует заметить, что стимуляцию лимфопоэза после введения лимфоидных клеток и продуктов их распада наблюдали многие исследователи [13, 19, 26].

Сравнение действия лимфоцитов «гипоксических», «кобальтовых» и «фенилгидразиновых» доноров на гемопоэз реципиентов показало, что различия в реакции кроветворения на трансплантацию этих клеток носили в основном количественный характер и не являлись принципиальными, поэтому можно полагать, что в основе всех изменений, производимых лимфоцитами в организме реципиентов, лежат одни и те же закономерности. В этой связи необходимо отметить, что наши представления о роли лимфоцитов в регуляции гемопоэза во многом согласуются с взглядами А.Г. Бабаевой [2—12], в исследованиях которой была показана важная роль лимфоидной системы в стимуляции регенерации некоторых органов и тканей.

Полученные нами данные, а также данные литературы мы свели в схему, в которой попытались последовательно изложить некоторые соображения об участии лимфоидных клеток в регуляции гемопоэза (рис. 3).

*Проблема лимфоидной регуляции гемопоэза
при экстремальных воздействиях на организм*

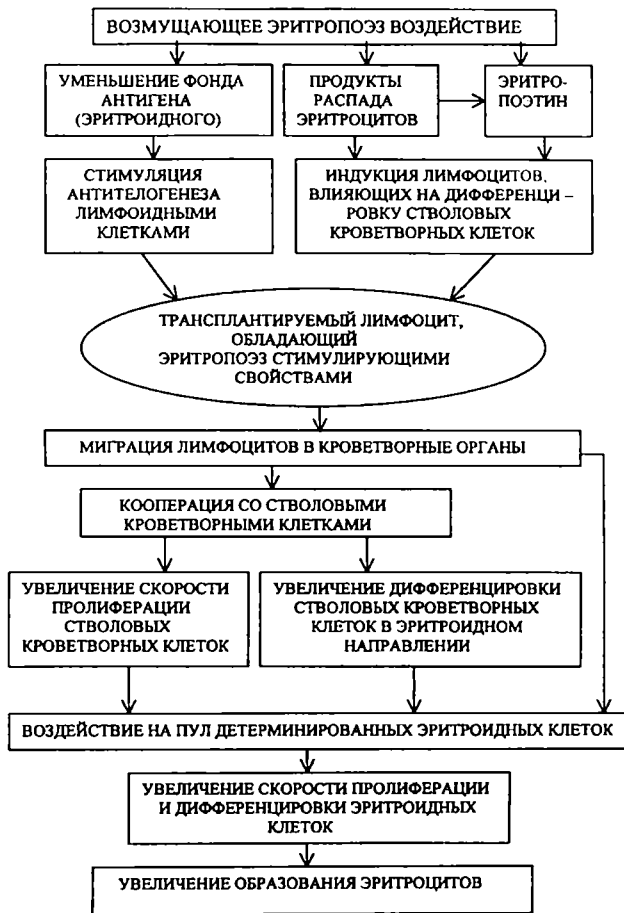


Рис. 3. Схема участия лимфоцитов в регуляции эритропоэза при экстремальных воздействиях на организм

Выводы

1. При воздействии на организм доноров экстремальных факторов, индуцирующих последующую активацию эритропоэза, лимфоидные клетки приобретают способность стимулировать эритропоэз у интактных реципиентов.

2. Лимфоидные клетки животных-доноров приобретают способность стимулировать эритропоэз у реципиентов после 6-часового воздействия гипоксической гипоксии, в то время как при 1-часовом воздействии гипоксии таких свойств у лимфоидных клеток не обнаруживается. Стимуляция эритропоэза у реципиентов сопровождается увеличением содержания ретикулоцитов и эритроцитов в периферической крови, гиперплазией эритроидного ростка костного мозга, увеличением содержания РНК и ДНК в эритроидных ядродержащих элементах костного мозга.

3. Воздействие на животных-доноров солей кобальта вызывает появление эритропоэзстимулирующих свойств их лимфоидных клеток. Наиболее высокой эритропоэзстимулирующей способностью обладают лимфоидные клетки животных через 16—18 часов после введения кобальта.

4. Лимфоидные клетки животных-доноров с финилгидразиновой анемией (взвесь клеток селезенки или тимуса), введенные интактным реципиентам, вызывают у них стойкую (в течение трех дней) стимуляцию эритропоэза.

5. Лимфоидные клетки «гипоксических» доноров активируют эритропоэз не только у интактных реципиентов, но также влияют на восстановление кроветворения у смертельно облученных реципиентов.

6. Воздействие хронической гипоксической гипоксии на животных с экспериментально вызванным снижением содержания лимфоцитов сопровождается меньшей стимуляцией эритропоэза, чем при действии на интактных животных.

7. Величина эритропоэзстимулирующего действия трансплантируемых лимфоидных клеток «гипоксических» доноров зависит от количества клеток во вводимой взвеси. Максимальное эритропоэзстимулирующее действие вызывает введение $20 \cdot 10^6$ — $160 \cdot 10^6$ клеток мышам-реципиентам, которое эквивалентно эритропоэтическому эффекту 1,0—1,3 единицы стандарта «С» эритропоэтина.

8. Стимулирующим действием на эритропоэз обладают только жизнеспособные лимфоидные клетки «гипоксических» животных. Введение таких лимфоидных клеток, разрушенных осмотическим цитолизом, не стимулирует эритропоэз у реципиентов так же, как и введение неразрушенных лимфоидных клеток интактных доноров.

9. В используемых для трансплантации клетках селезенки животных, которым вводился кобальт, не изменяются процессы потребления кислорода и окислительного фосфорилирования.

10. Введение реципиентам лимфоидных клеток доноров, подвергавшихся воздействию кобальта или гипоксической гипоксии, сопровождается функциональными изменениями пролиферирующего класса эритроидных клеток, проявляющимся в укорочении длительности параметров их жизненного цикла, а также в увеличении содержания и интенсивности синтеза нуклеиновых кислот.

11. Воздействие спленоцитов и тимоцитов «кобальтовых» и «гипоксических» доноров на реципиентов приводит к увеличению содержания стволовых кроветворных элементов в гемопоэтической ткани и к усилению их дифференцировки в эритроидном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агроскин Л.С., Папаян Г.В. Цитофотометрия. Аппаратура и методы анализа клеток по светопоглощению. — Л.: Наука, 1977.

2. Бабаева А.Г. Иммунологические реакции в процессах нормального и восстановительного роста. В кн.: Регенерация и клеточное деление. Материалы 5-й конференции по вопросам регенерации и клеточного деления. — М.: Медицина, 1968. — С. 11–16.

3. Бабаева А.Г. О роли системы иммуногенеза в регуляции процессов восстановления внутренних органов. Журнал общей биологии. — 1969, Т. 30, вып. 3, с. 304–316.

4. Бабаева А.Г. Иммунологические механизмы регуляции восстановительных процессов. — М.: Медицина, 1972.

5. Бабаева А.Г. Лимфоидная регуляция восстановления. В кн.: Новое в учении о регенерации. — М.: Медицина, 1977. — С. 196–307.

6. Бабаева А.Г. Лимфоидная регуляция восстановительного процесса. В кн.: Регуляция процессов регенерации и клеточного деления. Материалы симпозиума. — М.: Изд-во «МОИП», 1977. — С. 34–39.

7. Бабаева А.Г. Клеточные факторы иммунитета как регулятор процессов посттравматического восстановления органов у млекопитающих. В кн.: Механизмы регуляции в системе крови. — Красноярск, 1978, т. 1, с. 68-69.

8. Бабаева А.Г., Краскина Н.А., Лиознер Л.Д. Усиление митотической активности клеток печени неоперированных мышей под влиянием лимфоидных клеток частично гепатэктомированных доноров. Цитология. — 1969 а, т. 11, № 12. — С. 1511-1519.

9. Бабаева А.Г., Краскина Н.А., Лиознер Л.Д. Стимуляция пролиферативной активности клеток печени неоперированных мышей лимфоидными клетками частично гепатэктомированных доноров. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1969 б, т. 68, № 7, с. 91-94.

10. Бабаева А.Г., Алексеева Н.Ю., Гамбаров С.С., Головистиков И.Н. Изменение числа стволовых клеток в селезенке частично гепатэктомированных мышей на разных сроках регенерации печени. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1973 а, т. 75, № 8, с. 106-108.

11. Бабаева А.Г., Краскина Н.А., Лиознер Л.Д. Влияние лимфоидных клеток односторонне нефрэктомированных мышей на пролиферативную активность почек и печени неоперированных реципиентов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1973 б, т. 74, № 2, с. 78-80.

12. Бабаева А.Г., Юдина Н.В., Гамбаров С.С. Генетические различия реактивности лимфоидной ткани при регенерации печени у мышей различных линий. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1976, т. 82, № 7, с. 876-878.

13. Белянчикова Ю.В. Влияние продуктов распада лимфоцитов на лейкопоэз. В кн.: Материалы VIII конференции молодых научных сотрудников Центрального ордена Ленина института гематологии и переливания крови. — М.: 1972. — С. 98-100.

14. Бродский В.Я. Трофика клетки. — М.: Наука, 1966.

15. Гомеостаз. Под редакцией Горизонтова П.Д. — М.: Медицина, 1976 а.

16. Горизонтов П.Д. Роль лимфоидной ткани в процессах восстановления. В кн.: Механизмы нарушения и восстановления функций организма при некоторых патологических процессах. — Тбилиси, 1972. — С. 60-62.

17. Горизонтов П.Д. Лимфоидная ткань и неспецифическая резистентность организма. Архив патологии. — 1976 б, т. 38, вып. 3. — с. 3-13.

18. Горизонтов П.Д., Федотова М.И., Гудим В.И., Белоусова О.И. Сопоставление ранних реакций системы крови у крыс на иммобилизацию, воздействие гипоксической гипоксии и введение эритропоэтина. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1977, № 3, с. 44-49.

19. Гусенова Ф.М. Действие ядерной фракции лимфоцитов и гранулоцитов на гемопоэз интактных крыс. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1976, № 4. — С. 50-53.
20. Елифанова О.И., Терских В.В., Захаров А.Ф. Радиоавтография. — М.: Высшая школа, 1977.
21. Ерман Б.А., Низель В.М., Тхоржевский В.В., Мельников С.И. Интегрирующее устройство для автоматического суммирования оптических плотностей объектов при исследовании их методом последовательной цитофотометрии. Цитология. — 1968, т. 10, № 4, с. 525-528.
22. Зимин Ю.И. Изменение кроветворения у крыс при реакции стресс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1969, т. 66, № 7, с. 19-22.
23. Зимин Ю.И. Эмиграция клеток из селезенки в норме и при стресс-реакции. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1971, т. 70, № 6, с. 21-22.
24. Зимин Ю.И. Увеличение количества гемопоэтических родоначальных клеток у мышей в начальный период стресс-реакции. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1974, т. 79, № 12, с. 17-19.
25. Зосимовская А.И. Изучение митотических циклов клеток костного мозга. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. — 1962, т. 43, вып. 11, с. 99-111.
26. Кахтелидзе М.Г., Пригодина Т.А., Гусенова Ф.М., Курбанова Г.Н., Лиховещкая Э.М. Гуморальная регуляция лейкопоэза. В кн.: Механизмы повреждения, резистентности, адаптации и компенсации. Тезисы докладов II Всесоюзного съезда патофизиологов. — Ташкент, 1976, т. 1, с. 371-372.
27. Козлов О.Ю., Галямов А.Э., Минаков С.Д., Персверзев В.Д. Оценка специфической активности антитимоцитарной и антимакрофагальной сывороток. В кн.: Вопросы этиологии, эпидемиологии, патогенеза и диагностики вирусных заболеваний. Сборник научных трудов. — Свердловск, 1976. — С. 100-104.
28. Кондрашова М.Н. Принципиальные преимущества полярографического метода для изучения тканевого дыхания и пути совершенствования твердых электродов. В кн.: Материалы к научной конференции по определению напряжения кислорода в живых тканях полярографическим методом в эксперименте и клинике. — Горький, 1964. — С. 40-42.
29. Корсунская Т.И., Москалева Г.П., Гудим В.И., Серебрянная Б.А. Метод определения эритропоэтина на полицитемических мышцах. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1969, т. 13, № 3. — С. 77-79.

30. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. М., Медицина, 1975.

31. Лиознер Л.Д. Основные проблемы учения о регенерации. — М., Наука, 1975.

32. Лиознер Л.Д. Новое в учении о регенерации. — М., Медицина, 1977.

33. Монцвичюте-Эрингене Е.В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской практике. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1964, № 4, с. 71-78.

34. Нормальное кроветворение и его регуляция. Под редакцией Федорова Н.А. — М.: Медицина, 1976 б.

35. Петров Р.В., Сеславина Л.С. Явление взаимодействия лимфоцитов с кроветворными стволовыми клетками. Открытия, изобретения, промышленные образцы, товарные знаки. — 1978, № 15. — С. 3.

36. Петров Р.В., Швец В.Н. Взаимодействие стволовых кроветворных клеток с лимфоцитами. Проблемы гематологии и переливания крови, 1973, № 10. — С. 48—55.

37. Петровичев Н.Н. Влияние спленэктомии и блокады тушью купферовских клеток на митотическую активность гепатоцитов после гепатэктомии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1975, т. 80, № 7. — С. 91—93.

38. Путилов Б.С., Илюхин А.В., Зухбая Т.М., Маркелов Б.А. Цитофотометрический метод определения временных параметров жизненного цикла делящихся клеток. Проблемы гематологии и переливания крови. — 1972, т. 17, № 6. — С. 34-36.

39. Свет-Молдавский Г.Я., Шхвацабая И.К., Зинзар С.Н., Мхедизе Д.М., Литовченко Т.А., Чимишкян К.Л. Изучение пассивного переноса лимфоидными клетками компенсаторной гипертрофии миокарда. Доклады АН СССР. — 1974, т. 218, № 1, с. 246-248.

40. Сидорова В.Ф., Рябинина Э.А., Лейкина Е.М. Регенерация печени у млекопитающих. — Л., 1966.

41. Стрелин Г.С. Регенерация и лучевое повреждение. В кн.: Очерки по проблеме регенерации. — М., 1966, с. 151.

42. Сукерник Р.И., Скворцова Т.А., Леонтьева Л.И. Воспроизведение клеточных аутоиммунных реакций в печени мышей путем имплантации селезеночных клеток сингенных доноров с токсическим гепатитом. Цитология. — 1971, т. 13, № 5, с. 636-643.

43. Ужанский Я.Г. Физиологические механизмы регенерации крови. — М., Медицина, 1968.

*Проблема лимфоидной регуляции гемопоэза
при экстремальных воздействиях на организм*

44. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М., Медицина, 1975.

45. Федоров Н.А. Эритропоэтин — гормон эритропоэза. Вестник АМН СССР, 1976 а, № 9, с. 50—54.

46. Федотова М.И., Зимин Ю.И. Влияние аутооттрансплантации тимцитов на постлучевую регенерацию кроветворения. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1975, т. 79, № 6, с. 32—34.

47. Чертков И.Л., Воробьев А.И. Современная схема кроветворения. Проблемы гематологии и переливания крови. — 1973, т. 18, № 10, с. 3—13.

48. Швец В.Н. Клонирование стволовых клеток в костном мозге облученных мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1975, т. 79, № 5, с. 40—44.

49. Швец В.Н. Влияние лимфоцитов на гемопоэз в облученном организме. Радиобиология. 1976, т. 16, № 5, с. 707—711.

50. Ястребов А.П. О связи эритропоэза с окислительным обменом костного мозга. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1971, т. 70, № 2. — С. 18—20.

51. Berwald R.E., Arseneau Y.H., Dooley J. Effect of cobalt sulfate on erythrocyte count of splenectomized albino rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1934, № 32, p. 430.

52. Caspersen T. Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. Scand. arch. physiol., 1936, № 73, Suhhl. 8, p. 3—146.

53. Chance B., Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. 1. Kinetics of oxygen utilization. J. Biol. Chem., 1955, № 217, p. 735—741.

54. Davies A.S.S., Lauchars B., Doak Sh.M.A., Cross A.V. Regeneration relation to the lymphoid system. Nature (Engl.), 1964, 201, 4924, p. 1097—1101.

55. Dukor P., Miller J.F. Leberregeneration nach partieller Hepatektomie bei thymekomierten Mäusen. Naturwissenschaften, 1965, № 52, p. 189.

56. Einarsen L. On the theory of gallocyanin-chromolum staining and its application for quantitative estimation of basophilia. A selective staining exquisite progressivity. Acta Pathol. Scand., 1951, № 28, p. 83—102.

57. Feulgen R., Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure von Typus Thymusnukleinsäure und die darauf beruhende elective Farbung von Zellkernern in mikroskopischen Präparaten. J. physiol. Chem., 1924, № 135, p. 203—248.

58. Goldwasser E., Jacobson L.O., Fried W., Polzak L. Mechanism of the erythropoietic effect cobalt. Science, 1957, № 125, p. 1085—1086.

59. Goldwasser E., Jacobson L.O., Fried W., Polzak L. Studies on erythropoiesis. Y. The effect of cobalt on the production erythropoietin. Blood, 1958, № 13, p. 55–60.

60. Gurney C.W., Munt P., Brasell I., Hofstra D. Quantitation of the erythropoietic stimulus produced by hypoxia in the plethoric mouse. Acta haematol., 1965, № 33, p. 246.

61. Korst D., Wilhelm J., Frank H., Bethell F.M. Erythropoietin assay. J. Lab. a. Clin. Med., 1958, 52, № 5, p. 830.

62. Mantz J.M. Methode d'exploration quantitative de la moelle osseuse du rat blanc. Compt. R. Soc. Biol., 1957, 151, p. 1957–1960.

63. Orten J.M. Effect of splenectomy on production of cobalt polycythemia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1935, 32, № 7, p. 1091–1093.

64. Pliskin M.E., Prehn R.T. Stimulation of liver regeneration and compensatory kidney hyperplasia by passive transfer of spleen cells. J. of the Reticuloendothelial society, 1975, 17, № 5, p. 290–299.

65. Tennart I.R. Evaluation of the trypane blue technique for determination of cell viability. Transplantation, 1964, № 2, p. 685–694.

66. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat. Res., 1961, 14, № 2, p. 213–222.

67. Woodruff M.F., Beid B., James K. Effect of antilymphocytic antibody and antibody fragments of human lymphocytes in vitro. Nature (Engl.), 1967, 215, № 5101, 591–594.