ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансплантация костного мозга мышам с экспериментальной моделью туберкулеза

А.А. Исаев[1], Л.Е. Поспелов [2], И.В. Бочарова [2], В.Я. Гегерт [2], Д.С. Станков[1], А.В. Приходько[1], В.Г. Авдиенко [2], А.Л. Поспелов [2]

[1]ОАО «Институт стволовых клеток человека», Москва
[2]ГУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва

Исследовали эффективность применения клеток костного мозга (ККМ) в лечении экспериментального туберкулеза. Было показано, что трансплантация аллогенных клеток костного мозга от мышей линии AKR, резистентных к туберкулезу, мышам линии C57BL/6, чувствительным к туберкулезу и зараженным микобактериями штамма H37Rv, позволила значительно продлить жизнь зараженным экспериментальным животным и уменьшить число микобактерий, высеваемых из органов, по сравнению с нелеченными животными. Изучение гуморального иммунитета показало, что введение аллогенных клеток костного мозга приводит к неспецифической полиизотипической стимуляции противотуберкулезных антител, что важно в создании протективного гуморального фона. Также была обнаружена выраженная выработка IgG2a антител в сравнении с уровнем IgG1 антител при терапии клетками костного мозга, которая указывает на наличие Th1-ответа, который носит при туберкулезе явный протективный характер. Высокий уровень IgG2a антител коррелировал с высоким уровнем специфического клеточного иммунного ответа, оцениваемого по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Ключевые слова: туберкулез, костный мозг, антитела, иммунитет.

Введение

Имеются отдельные публикации о правомерности применения стволовых клеток при некоторых заболеваниях, в этиологии которых присутствует инфекционное начало, например, при ВИЧ инфекции [1, 2]. Однако до сих пор трансплантация ККМ при терапии туберкулеза не проводилась. Известно, что восприимчивость к туберкулезной инфекции зависит от состояния иммунной системы организма [3]. Все иммунокомпетентные клетки возникают из клеток-предшественников и стволовых клеток костного мозга. В связи с этим нами была выдвинута гипотеза, что введение аллогенных ККМ от резистентных к туберкулезу мышей может повысить сопротивляемость организма животных, чувствительных к туберкулезной инфекции, и зараженных микобактериями.

Целью работы было изучение влияния клеток костного мозга при лечении экспериментального туберкулеза, вызванного микобактериями штамма H37Rv, у мышей линии C57BL/6. Для этого определяли показатели выживаемости животных после заражения, высеваемости микобактерий из органов зараженных животных, реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на туберкулин и специфический антительный ответ при трансплантации клеток костного мозга (ККМ).

Материал и методы. Экспериментальные животные и трансплантация ККМ

Для экспериментальных исследований использовали мышей инбредных линий C57BL/6, AKR, содержащихся в питомнике ГУ ЦНИИТ РАМН. Клетки костного мозга получали из бедренных костей мышей линии AKR и C57BL/6 на холоду, ресуспендировали в среде 199, однократно отмывали в среде 199 и доводили до концентрации 6 млн клеток в 0,3 мл суспензии на 1 инъекцию на мышь. Мыши линии AKR считаются резистентными по отношению к микобактериям туберкулеза (МБТ), а мыши линии C57BL/6 – чувствительными. Это заключение было сделано на основании высеваемости жизнеспособных микобактерий из органов мышей различных линий, а также на основании выживаемости животных после заражения M.tuberculosis H37Rv [3, 4].

При выборе дозы трансплантации ККМ исходили из факта, что болезнь рант у мышей (отставание в росте и дистрофия при трансплантации аллогенных иммунокомпетентных клеток) развивается при введении более 10 млн клеток селезенки взрослых доноров.

Мышей линии C57BL/6 заражали смертельной дозой ($1x10^7$ КОЕ) микобактерий туберкулеза H37Rv.

Все экспериментальные животные были разделены на следующие группы:

1 группа – инфицированные животные, не получающие лечения – 10 шт;

2 группа – инфицированные животные, получающие противотуберкулезный препарат изониазид в дозе 38,5 мг/кг – 10 шт;

3 группа – инфицированные животные, получающие противотуберкулезный препарат изониазид в дозе 38,5 мг/кг и ККМ линии AKR (аллогенная трансплантация) – 10 шт;

4 группа – инфицированные животные, получающие только ККМ линии AKR (аллогенная трансплантация) – 10 шт;

5 группа – инфицированные животные, получающие только ККМ линии C57BL/6 (сингенная трансплантация) – 10 шт.

Изониазид вводили внутрижелудочно через 3 дня после заражения ежедневно в течение 2 месяцев, ККМ вводили внутривенно в хвостовую вену мышей также через три дня после заражения еженедельно в течение 2 месяцев.

Также для изучения влияния ККМ на реактивацию туберкулезного процесса мышам C57BL/6, зараженным 1×10^7 КОЕ МБТ, в течение 2 месяцев ежедневно, через 2 недели после заражения, вводили перорально противотуберкулезные препараты изониазид и рифампицин. Затем часть экспериментальных животных оставляли для реактивации туберкулезного процесса (**группа 6**), а другой группе мышей вводили еженедельно в течение двух месяцев ККМ

линии AKR (**группа 7**). После этого у части животных из двух сравниваемых групп высевали МБТ из органов (легких).

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили в 96 луночных планшетах с высокой связывающей способностью (Costar, США), которые сенсибилизировали комплексным антигенным препаратом культурального фильтрата Mycobacterium tuberculosis H37Rv в концентрации 10 мкг/мл в течение 18 часов при 4°С. После отмывки PBS, содержащим 0,1% Tween 20, в планшеты вносили сыворотки исследуемых животных в разведениях 1:400, 1:1600, 1:6400. После часовой инкубации и отмывки PBS–Tween в планшеты добавляли разведения вторых антител, меченных пероксидазой хрена, иммунопероксидазные коньюгаты, направленные против поливалентных IgG (Sigma, США), подклассов IgG1, IgG2a (ICN, США), IgM и IgA (Sigma, США). После инкубации в течение часа планшеты отмывали PBS–Tween и в лунки вносили субстрат цветной реакции, содержащий цитратный буфер, перекись водорода и тетраметилбензидин. После инкубации в темноте в течение 15 минут реакцию останавливали 1М серной кислотой. Оптическую плотность считывали при 450 нм.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа

Для изучения уровня специфического клеточного противотуберкулезного иммунитета ставили реакцию ГЗТ. Для этого в подушку одной из лап опытных животных вводили туберкулин, а в другую (контроль) – физиологический раствор и сравнивали уровень местной кожной реакции каждой из лап.

Статистика

Для сравнения животных по выживаемости рассчитывали среднюю продолжительность жизни животных в группе и сравнивали по стандартному критерию Стьюдента.

При расчете уровня антител каждое разведение сыворотки рассчитывали как среднее по группе из 4–5 животных с учетом ошибки среднего.

Для сравнения числа высеваемых микобактерий из органов зараженных животных и сравнения показателей ГЗТ также использовали стандартный критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Основными показателями резистентности животного к туберкулезу являются срок выживаемости после инфицирования и число микобактерий, высеваемых из тропных к туберкулезу органов экспериментальных животных.

Как показали исследования, у зараженных мышей линии C57BL/6 контрольной группы, не получавших никаких препаратов, выживаемость после смертельной дозы заражения составила 24,8±1,42 дня. Выживаемость мышей, которым вводили сингенные клетки (5-я группа), была практически сравнима с контролем. Мыши, получавшие ежедневно изониазид в течение 2 месяцев (2-я группа), изониазид и клетки костного мозга одновременно (3-я группа) и только клетки костного мозга (4-я группа) оставались живы в течение всего срока наблюдения – 6 месяцев. Результат выживаемости мышей представлен в табл. 1.

Таблица 1. **Результаты выживаемости мышей линии C57BL/6, зараженных микобактериями туберкулеза, после введения клеток костного мозга мышей сингенной и аллогенной линий**

Линия мышей, из которых выделены ККМ	Трансплантация клеток костного мозга	Выживаемость, дни
Контроль	Не вводились	24,8±1,42
C57BL/6	Сингенная	21±1,27
AKR	Аллогенная	180±0

После окончания лечения, через 2 месяца и через 4 месяца часть животных (по 3 мыши из каждой группы) была умерщвлена для оценки высеваемости микобактерий туберкулеза из органов мышей (остальные животные были оставлены для дальнейшего наблюдения). Результаты высеваемости микобактерий туберкулеза представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, даже по прошествии 2 месяцев после окончания трансплантации ККМ (группа 4) число микобактерий в органах было значительно снижено по сравнению с животными без лечения, которые погибли через 24,8 дня. В первом разведении клеточной суспензии легких мышей из групп 3 и 4 не удалось выявить выросшие колонии микобактерий.

МБТ высевались из легких мышей, получавших только ККМ. Через 4 месяца после окончания лечения из легких зараженных мышей всех групп высевались МБТ, хотя в группах с применением химиотерапии число колоний было значительно меньше по сравнению с группой мышей, которым вводили только ККМ. Разница была статистически достоверна.

Таблица 2. **Результаты высеваемости микобактерий туберкулеза из органов зараженных животных, (КОЕ)**

Способ лечения	Через 2 месяца после лечения*		Через 4 месяца после лечения
	селезенка	легкие	легкие
Контроль (без лечения)*	$(2,6\pm0,4)\times10^9$	$(5,5\pm0,6)\times10$	
Клетки костного мозга	$(2,9\pm0,3)\times10^5$	$(9,3\pm0,1)\times10^5$	$(6,6\pm3,7)\times10^6$
Изониазид	$(5,8\pm0,6)\times10^3$	0**	$(4,0\pm0,7)\times10$
Клетки костного мозга + изониазид	$(5,3\pm1,6)\times10^3$	0**	$(3,9\pm2,3)\times10^3$
	t_{1-2}= 4,79; p=0,002 t_{2-3}=12,88; p=0,000	t_{1-2}= 5,96; p=0,000	t_{2-3}= 2,11; p=0,056

* Срок продолжительности жизни «контрольной группы» указан в табл. 1.

** На первом разведении клеточной суспензии легких мышей из групп 3 и 4 не удалось выявить выросшие колонии микобактерий.

Таблица 3. ***Уровень антител иммуноглобулинов (оптическая плотность, M ± m) у мышей, зараженных M. tuberculosis штамма H37Rv, получавших аллогенные ККМ, традиционную химиотерапию или сочетание двух подходов***

Уровень антител				
иммуноглобулины (класс, подкласс)	**разведение сыворотки**	**клетки костного мозга**	**клетки костного мозга + химиотерапия**	**химиотерапия**
Общий IgG	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	2,003±0,250 1,203±0,377 0,453±0,190	1,161±0,186 0,369±0,057 0,087±0,014	1,228±0.313 0,422±0,125 0,107±0,029
IgG1	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	0,357±0,076 0,133±0,031 0,054±0,012	0,057±0,016 0,026±0,009 0,009±0,004	0,086±0,030 0,038±0,021 0,014±0,010
IgG2a	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	0,458±0,142 0,213±0,082 0,089±0,026	0,403±0,177 0,219±0,106 0,079±0,037	0,158±0,125 0,056±0,038 0,024±0,015
IgM	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	1,166±0,177 0,556±0,096 0,185±0,034	0,357±0,103 0,160±0,055 0,054±0,020	0,478±0,148 0,178±0,069 0,053±0,022
IgA	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	0,209±0,069 0,076±0,024 0,025±0,007	0,023±0,003 0,009±0,002 0,006±0,000	0,064±0,003 0,021±0,003 0,014±0,010

Уровень процесса реактивации оценивали по высеваемости МБТ из легких мышей групп 6 и 7. У мышей, получавших только химиотерапию (группа 6) уровень высеваемых МБТ равнялся (2,93±1,54) x 10^2, а у мышей, которым вводили дополнительно аллогенные ККМ линии AKR (группа 7), уровень высеваемых МБТ равнялся (1,60±0,46) x 10^2. Однако разница не была статистически достоверна.

В табл. 3 приведены результаты исследования уровня специфических антител (оптическая плотность при 450 нм) в сравниваемых группах зараженных животных в зависимости от разведения и исследуемого класса или подкласса. Как видно из приведенных данных, группа животных, получавших терапию аллогенным трансплантатом клеток костного мозга, имеет значительно более высокие значения уровня антимикобактериальных антител во всех исследуемых классах. Также высокие уровни антител наблюдаются и при исследовании антительного ответа по подклассам IgG, IgG1, IgG2a. Аналогичная картина наблюдается при исследовании IgA антител. Ответ IgG2a антител имеет явно более выраженный характер в сравнении с ответом IgG1 антител.

Наиболее заметный факт при исследовании антимикобактериальных антител выявляется в группе мышей, получавших аллогенный трансплантат клеток костного мозга. Он проявляется в полиизотипической стимуляции иммуноглобулинов всех классов, приводя к высокой авидности (уровню) среди всех классов. При длительной химиотерапии также сохраняется повышенный уровень антител IgG и IgM классов. Аналогичный ответ наблюдается при протективном ответе на L-арабиноманнан, отражающем уровень его экспрессии самой микобактерией, и напрямую зависит от числа возбудителей в органах хозяина [5].

При изучении уровня специфического клеточного иммунитета показано, что он был самым низким при применении химиотерапии (табл. 4). Наиболее высокий специфический клеточный иммунный ответ, оцениваемый по реакции ГЗТ, обнаружен в группе мышей, которым вводили клетки костного мозга.

Таблица 4. **Уровень специфического клеточного иммунитета у мышей при различных способах лечения туберкулеза**

Способ лечения	Реакция ГЗТ	t; p
Контроль (без лечения)	0,037±0,001	
Клетки костного мозга	0,044±0,014	t_{2-4}=4,10; p=0,001
Клетки костного мозга + изониазид	0,033±0,001	t_{3-4}=2,68; p=0,02
Изониазид	0,016±0,01	

При изучении уровня реактивации туберкулезного процесса по высоте специфического антительного ответа у мышей в группах 6 и 7 обнаружено значительное нивелирование уровней ответа, хотя более высокие показатели наблюдаются в группе, получавшей только химиотерапию для антимикобактериальных поливалентных IgG, IgG2a и IgM антител (табл. 5).

Список заболеваний, в терапии которых исследователи и клиницисты пытаются использовать стволовые клетки, все время расширяется. Однако при лечении инфекций этот список пока не так велик, к нему относится, например, ВИЧ-инфекция, в терапии которой достигнуты определенные положительные результаты [1, 2]. При использовании клеток костного мозга в терапии экспериментального туберкулеза у мышей нами показан протективный эффект в отношении туберкулезной инфекции, выражающийся в значительном увеличении жизни мышей и сдерживании роста микобактерий в исследуемых органах зараженных животных.

Известно, что протективный противотуберкулезный ответ определяется ответом Th1, для которых характерна активная секреция антител IgG2a подкласса. Так, протективная

Таблица 5. **Антимикобактериальный антительный ответ у зараженных МБТ мышей при реактивации туберкулезного процесса при разных способах лечения**

Уровень антител			
иммуноглобулины (класс, подкласс)	**разведение сыворотки**	**клетки костного мозга + химиотерапия**	**химиотерапия**
Общий IgG	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	1,507±0,172 0,722±0,132 0,224±0,059	1,852±0,199 0,886±0,180 0,198±0,053
IgG1	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	0,114±0,052 0,041±0,014 0,012±0,004	0,042±0,015 0,014±0,006 0,006±0,004
IgG2a	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	0,135±0,051 0,053±0,017 0,027±0,007	0,206±0,142 0,088±0,050 0,026±0,020
IgM	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	0,458±0,152 0,208±0,074 0,067±0,023	0,935±0,143 0,313±0,059 0,096±0,012
IgA	1 : 400 1 : 1600 1 : 6400	0,049±0,006 0,018±0,002 0,010±0,002	0,060±0,011 0,020±0,002 0,010±0,001

иммунизация мультивалентной вакциной 6Ag (содержащей 85B, 38кДа, ESAT-6, CFP21, Mtb8.4, and 16кДа) сопровождается высокими уровнями IgG2a антител [6]. В другом случае, при введении ДНК-вакцины ESAT6 и развитии протективного ответа, также наблюдается повышенное содержание IgG2a по отношению к IgG1 [7]. Для всех групп в исследовании характерны более высокие уровни противотуберкулезных IgG2a в сравнении с IgG1, хотя в случае трансплантации аллогенных клеток костного мозга, уровень IgG1 антител достаточно высок, но не превышает уровня IgG2a, что, как указывалось выше, является результатом полиизотипической стимуляции.

Наличие противотуберкулезных IgA не столь выражено во всех группах, за исключением группы, получавшей клетки костного мозга, что, как и в случае с IgG и IgM классами, носит неспецифический характер полиизотипической стимуляции. Появление противотуберкулезных антител класса IgA против микобактериального антигена альфа-кристаллина на ранних стадиях инфекции крайне важно для успешной протекции, особенно в случае их выделения в виде секреторных IgA [8].

С высоким уровнем специфических IgG2a антител коррелирует и высокий уровень реакции ГЗТ в группах опытных животных, получавших в качестве лечения трансплантацию ККМ, несмотря на применяемую химиотерапию.

Заключение

Подводя итог вышесказанному, можно сделать некоторые предварительные выводы:

- трансплантация аллогенных клеток костного мозга зараженным микобактериями мышам позволила значительно продлить жизнь зараженным экспериментальным животным, а также снизить уровень высеваемых МБТ из органов зараженных мышей;
- введение аллогенных клеток костного мозга приводит к неспецифической полиизотипической стимуляции выработки противотуберкулезных антител, что важно в создании протективного гуморального фона;
- выраженная выработка IgG2a антител в сравнении с уровнем IgG1 антител при терапии клетками костного мозга, указывает на наличие Th1-ответа, который носит при туберкулезе явный протективный характер.

Дальнейшая работа будет посвящена исследованию влияния различных фракций клеток костного мозга при лечении экспериментального туберкулеза.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Krishanan A. et al. Durable remission with autologous stem cell transplantation for high-risk HIV-associated lymphomas. Blood 2005; 105(2): 874-8.
2. Lane H.C. et al. Syngenic bone marrow transplantation and adoptive transfer of peripheral blood lymphocytes combined with ridovudine in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann. Intern. Med. 1990; 113: 512.
3. Авербах М.М., Мороз А.М.,. Апт А.С., Никоненко Б.В. Иммуногенетика инфекционных заболеваний. М., Медицина; 1985.
4. Gros P., Skamene E., Forget A. Genetic control of natural resistance of mycobacterium bovis (BCG) in mice. J. Immunol. 1981; 127: 2417-21.
5. Schwebach J.R., Casadevall A, Schneerson R. et al. Expression of a Mycobacterium tuberculosis arabinomannan antigen in vitro and in vivo. Infect. Immun. 2001; 69(9): 5671-8.
6. Hovav A.H., Fishman Y., Bercovier H. Gamma interferon and monophosphoryl lipid A-trehalose dicorynomycolate are efficient adjuvants for Mycobacterium tuberculosis multivalent acellular vaccine. Infect. Immun. 2005; 73(1): 250-7.
7. Wang Q.M., Sun S.H., Hu Z.L. et al. Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. Vaccine 2004; 22(27-28): 3622-7.
8. Williams A., Reljic R., Naylor I. et al. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. Immunology 2004; 111(3): 328-33.