

## ПОДХОДЫ К КОРРЕКЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ АУТОИММУННЫХ МЫШЕЙ MRL-*lpr/lpr*

Наталья Александровна ФЕОФАНОВА, Людмила Борисовна ТОПОРКОВА, Марина Александровна ТИХОНОВА, Елена Рэмовна ЧЕРНЫХ, Георгий Александрович НЕВИНСКИЙ, Владимир Александрович КОЗЛОВ, Ирина Анатольевна ОРЛОВСКАЯ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН  
630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

Для изучения возможности коррекции функциональной активности костномозговых гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) Fas-дефектных мышей MRL-*lpr/lpr* с нарушенным апоптозом клеток использовались препараты, направленные на стимуляцию апоптоза — вортманнин (ингибитор фосфоинозитид-3-киназы, PI3K), H7 (ингибитор протеинкиназы C, PKC) и ролипрам (ингибитор фосфодиэстеразы 4, PDE4). Показано, что все препараты усиливали апоптоз CD34<sup>+</sup> клеток (H7 и ролипрам — достоверно), при этом в присутствии H7 и ролипрама наблюдалась тенденция к снижению количества S/G2M клеток. Обнаружено, что обработка клеток костного мозга (ККМ) препаратами приводит к снижению числа эритроидных колоний, повышенного у старых мышей MRL-*lpr/lpr*.

**Ключевые слова:** CD34<sup>+</sup> клетки, гемопоэтические предшественники, апоптоз, дифференцировка, пролиферация.

У Fas-дефектных мышей MRL-*lpr/lpr*, несущих мутантный ген *lpr*, нарушен апоптоз иммунокомпетентных клеток, что приводит к появлению аутореактивных популяций, а также большого количества специфических для аутоиммунного процесса субпопуляций (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) Т-лимфоцитов, результатом чего является формирование тяжелой лимфаденопатии, сопровождаемой продукцией разнообразных аутоантител, иммунных комплексов, а также гломерулонефритом [1,2]. Ранее нами показано, что уровень апоптоза CD34<sup>+</sup> клеток снижается по мере формирования аутоиммунного заболевания (АИЗ) мышей MRL-*lpr/lpr*, обнаружено повышение пролиферативной активности популяции CD34<sup>+</sup> клеток по сравнению с соответствующим показателем контрольных мышей (CBAx57Bl/6)F1-гибридов [3]. Показано также нарушение пролиферативно-дифференцировочных потенций ГСК: увеличение количества эритроидных колоний в костном мозге уже на ранних стадиях развития АИЗ, до появления

протеинурии [4].

В последние годы формируются новые подходы к коррекции аутоиммунной патологии путем воздействия на внутриклеточные сигнальные пути, опосредующие основные события в жизненном цикле клетки, такие как пролиферация, дифференцировка, выполнение специфических функций и апоптоз. В данной работе с целью коррекции функциональных параметров ГСК *in vitro* использовались препараты, направленные на стимуляцию апоптоза клеток — вортманнин (ингибитор PI3K), H7 (ингибитор PKC) и ролипрам (ингибитор PDE4).

### Методика исследования

До эксперимента животных (мыши MRL-*lpr/lpr*) содержали в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Эксперименты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986) и одобрен-

Феофанова Н.А. — м.н.с., лаборатория иммунобиологии стволовой клетки

Топоркова Л.Б. — к.б.н. с.н.с., лаборатория иммунобиологии стволовой клетки

Тихонова М.А. — к.б.н., с.н.с. лаборатория клеточной иммунотерапии

Черных Е.Р. — д.м.н., проф., заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии

Невинский Г.А. — д.х.н., проф., зав. лабораторией ферментов репарации

Козлов В.А. — д.м.н., проф., академик РАМН, директор

Орловская И.А. — д.м.н., проф., зав. лабораторией иммунобиологии стволовой клетки, e-mail: irorl@mail.ru

Таблица

Модуляция параметров клеточного цикла и апоптоза CD34<sup>+</sup> клеток костного мозга мышей MRL-lpr/lpr в условиях ингибции PI3K (вортманнин), PKC (H-7) и PDE4 (ролипрам) M±m

Показатель	контроль (16 мышей)	вортманнин (14 мышей)	H7 (16 мышей)	ролипрам (16 мышей)
CD34 (%)	3,2±0,6	2,3±0,2	2,8±0,4	2,4±0,3
Апоптоз (%)	7,8±1,5	13±4,2	18±2,6*	16±3,2*
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	76±5,4	69±6,2	70±5,1	71±5
S/G <sub>2</sub> M (%)	16±4,6	17±3,9	12±3,5	13±3,7
IND (G <sub>0</sub> G <sub>1</sub> /SG <sub>2</sub> M)	20±6,2	11±3,7	21±6,7	32±13,6

\* — отличие от контроля достоверно при  $p < 0,05$ .

ными комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. На основании данных литературы и собственных исследований основным диагностическим критерием развития гломерулонефрита в нашей модели следует считать стойкое наличие белка в моче более 3 мг/мл [5]. Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Кумасси бриллиантовый синий; калибровочную кривую строили по BSA («Sigma») (100-1000 мкг/мл), результаты выражали в мг/мл. В работе использовались мыши MRL-lpr/lpr в возрасте 12-23 месяцев с клинической манифестацией АИЗ (протеинурия).

Клетки костного мозга (ККМ) вымывали охлажденной культуральной средой из бедренных и больших берцовых костей. ККМ инкубировали со стимуляторами апоптоза в течение 3-4 часов, дозы препаратов выбраны в соответствии с литературными данными: вортманнин — 0,5 мкМ [6], H-7 — 30 мкМ [7], ролипрам — 10 мкМ [8].

Методом проточной цитофлуориметрии (FACSCallibur, Becton Dickinson) оценивалось относительное содержание CD34<sup>+</sup> популяции среди клеток костного мозга; оценивали клеточный цикл по содержанию ДНК в клетках, окрашенных пропидиумом иодидом (Propidium iodide, 4 мкг/мл, Sigma) [9]. Для этого использовали моноклеарные клетки, предварительно обработанные FITC-меченными анти-CD34 моноклональными антителами (PharMingen, San Diego, США). Среди CD34<sup>+</sup> клеток (зеленая флуоресценция) определяли относительное содержание клеток с диплоидным (клетки в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фазах клеточного цикла) и гипердиплоидным (клетки в S/G<sub>2</sub>M фазах клеточного цикла) набором ДНК. Апоптотические клетки, ДНК которых подвергалась фрагментации, формировали характерный

гиподиплоидный пик (оранжевая флуоресценция).

Для определения числа коммитированных предшественников клетки костного мозга в концентрации 2,5x10<sup>4</sup>/мл инкубировались в метилцеллюлозной среде М 3434 (Stem Cell Technology, Canada), содержащей фактор стволовых клеток (SCF), эритропоэтин, IL-3, IL-6. Гранулоцитарно-макрофагальные и эритроидные колонии (КОЕ-ГМ, БОЕ-Э, КОЕ-Э) подсчитывались под микроскопом после 14-дневной инкубации при температуре 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Для статистической обработки данных применяли методы корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение рядов проводили методом непараметрической статистики с использованием критерия Mann-Whitney (Statistica 5).

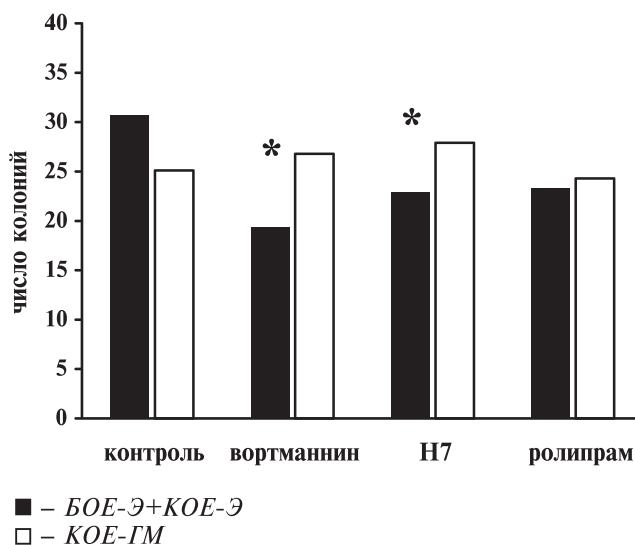
#### Результаты исследования

В последние годы накапливаются данные об изменениях функциональной активности ГСК при АИЗ; делаются предположения о патогенетической роли этих изменений [10, 11], что дает основание рассматривать гемопоэтические предшественники как возможную мишень для терапевтических воздействий. Для изучения возможности коррекции функциональной активности ГСК Fas-дефектных мышей MRL-lpr/lpr с нарушенным апоптозом клеток использовались препараты, направленные на стимуляцию апоптоза: вортманнин, H7 и ролипрам. Показано (табл.), что все анализируемые препараты усиливали апоптоз костномозговых CD34<sup>+</sup> клеток: вортманнин — в виде тенденции, H7 и ролипрам — достоверно. При этом усиление апоптоза в присутствии H7 и ролипрама ассоциировалось с тенденцией к снижению количества клеток, находящихся в S/G<sub>2</sub>M фазах клеточного цикла. При анализе корреляцион-

ных связей выявлены различия модулирующей активности анализируемых веществ. Так, в контрольной группе (без воздействий) уровень апоптоза обратно коррелирует с долей  $G_0/G_1$  клеток. В присутствии вортманнина эта связь еще сильнее. На фоне Н7 уровень апоптоза обратно коррелирует не только с количеством клеток в  $G_0/G_1$ , но и с индексом соотношения клеток в  $G_0/G_1$  и  $S/G_2M$ . Т.е. усиление апоптоза в присутствии данного модулятора ассоциировано с изменением клеточного цикла. И хотя ролипрам также достоверно усиливает апоптоз, это не отражается на соотношении клеток в  $G_0/G_1$  и  $S/G_2M$  (между уровнем апоптоза и IND связи нет). Таким образом, из трех препаратов, усиливающих апоптоз, только Н7 меняет при этом клеточный цикл.

Известные к настоящему времени данные об участии PI3K в гемо- и лимфопоэзе позволяют предполагать, что нарушения в регуляции этого сигнального пути, приводящие к его гиперактивации, могут вызывать развитие аутоиммунных или опухолевых заболеваний [12, 13, 14]. Ингибитор PI3K вортманнин подавляет дифференцировку, усиливая пролиферацию миелоидных предшественников; в отношении эритроидных предшественников, напротив, наблюдается снижение их пролиферации при подавлении активности PI3K — таким образом, PI3K является одним из внутриклеточных регуляторов соотношения числа эритроидных и миелоидных предшественников [15]. Н7 — ингибитор PKC, фосфорилирующей митохондриальные антиапоптотические белки Bcl-2. Эритроидная дифференцировка  $CD34^+$  клеток в присутствии эритропоэтина и SCF сопровождается повышением уровня PKC $\alpha$  и PKC $\beta$ , а миелоидная — даун-регуляцией этих изоформ. Ингибиторы PKC подавляют эритроидную дифференцировку клеток  $CD34^+$  [16]. Ролипрам — ингибитор PDE4 и активатор протеинкиназы A — усиливает апоптоз через дефосфорилирование проапоптотического белка Bad. Обработка ролипрамом *in vitro* дозозависимо снижает число гемопоэтических колоний и повышает уровень апоптоза гемопоэтических предшественников у больных бронхиальной астмой, но не влияет на колониобразование и выживаемость донорских гемопоэтических предшественников [17].

Исследовалась возможность коррекции с помощью вышеперечисленных воздействий дифференцировочных потенциалов стволовых кроветворных клеток старых больных мышей MRL lpr/lpr, в костном мозге которых отме-



\* достоверные различия с контролем ( $p < 0,05$ ).

**Рис.** Влияние ингибиторов PI3K (вортманнин), PKC (Н-7) и PDE4 (ролипрам) на формирование гемопоэтических колоний в костном мозге старых мышей MRL-lpr/lpr

чается значительное повышение числа эритроидных (БОЕ-Δ+КОЕ-Δ) колоний [4]. Показано (рис.), что все препараты снижают количество эритроидных колоний, при этом воздействие вортманнина и Н7 приводило к достоверному снижению числа (БОЕ-Δ+КОЕ-Δ).

Полученные нами данные о коррекции функциональных параметров ГСК при аутоиммунной патологии (мыши MRL-lpr/lpr) позволяют предполагать возможность исследования роли стимуляторов апоптоза в терапии АИЗ (в том числе при трансплантациях клеток костного мозга).

#### Литература

1. Nagata S., Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations // Immunol. Today. 1995. 16: 39-43.
2. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G. et al. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis // Nature. 1992. 356:314-317.
3. Феофанова Н.А., Топоркова Л.Б., Тихонова М.А. и др. Клеточный цикл костномозговых  $CD34^+$  клеток в процессе развития аутоиммунного заболевания у мышей MRLMpJ/lpr. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. (3): 154-156.
4. Feofanova N.A., Toporkova L.B., Tikhonova M.A. etc. Cellular cycle of intramedullary  $CD34^+$  cells in the process of development of autoimmune disease of mice MRLMpJ/lpr // Kletochnye tekhnologii v biologii I meditsine. 2006. (3): 154-156.
4. Toporkova L.B., Dubrovskaya V.V., Sakhno L.V. et al. Hematopoietic progenitor colony formation in the

immunopathogenesis of the autoimmune disorder in MRL/MpJ-lpr mice. Russ. J. Immunol. 2002. Vol. 7. P. 245-250.

5. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Логинов В.А. и др. Показатели эритро- и иммунопоэза в развитии аутоиммунных заболеваний, индуцированных хронической реакцией трансплантат против хозяина // Вестник АМН СССР. 1991. 12. :13-16.

Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Loginov V.A. etc. Indexes of erythro- and immunopoesis in development of autoimmune diseases induced by transplant chronic reaction against host // Vestnik AMN SSSR. 1991. 12: 13-16.

6. Sui X., Krantz S., You M., Zhao Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. Blood. 1998. Vol. 92. P. 1142-1149.

7. Ohkusu K., Isobe K., Hidaka H., Nakashima I. Elucidation of the protein kinase C-dependent apoptosis pathway in distinct subsets of T lymphocytes in MRL-lpr/lpr mice. Eur J. Immunol. 1995. Vol. 25. P. 3180-3186.

8. Moon E., Lerner A. PDE4 inhibitors activate a mitochondrial apoptotic pathway in chronic lymphocytic leukemia cells that is regulated by protein phosphatase 2A. Blood. 2003. Vol. 101. P. 4122-4130.

9. Ayala A., Herdon C.D., Ayala C.A., et al. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. Blood. 1996. Vol. 87. P. 4261-4275.

10. Wang X., Hisha H., Cui W. et al. The characteristics of hematopoietic stem cells from autoimmune-prone mice and the role of neural cell adhesion molecules

in abnormal proliferation of these cells in MRL/lpr mice. Haematologica. 2007. Vol. 92. P. 300-307.

11. Andryushkova A.A., Kuznetsova I.A., Bineva V.N. et al. Formation of different abzymes in autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice is associated with changes in colony formation of haematopoietic progenitors. J. Cell. Mol. Med. 2007. Vol. 11. P. 531-551.

12. Oak J.S., Fruman D.A. Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in autoimmunity. Autoimmunity. 2007. Vol. 40. P. 433-441.

13. Patel R.K., Mohan C. PI3K/AKT signaling and systemic autoimmunity. Immunol. Res. 2005. Vol. 31. P. 47-55.

14. Fleischer A., Ghadiri A., Dessauge F. et al. Modulating apoptosis as a target for effective therapy. Mol. Immunol. 2006. Vol. 43. P. 1065-1079.

15. Lewis J.L., Marley S.B., Ojo M., Gordon M.Y. Opposing effects of PI3 kinase pathway activation on human myeloid and erythroid progenitor cell proliferation and differentiation in vitro. Exp. Hematol. 2004. Vol. 32. P. 36-44.

16. Myklebust J.H., Smeland E.B., Josefsen D., Sioud M. Protein kinase C- $\alpha$  isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34(+) progenitor cells from human bone marrow. Blood. 2000. Vol. 95. P. 510-518.

17. Wang C.H., Lin H.C., Lin C.H. et al. Effect of theophylline and specific phosphodiesterase IV inhibition on proliferation and apoptosis of progenitor cells in bronchial asthma. Br. J. Pharmacol. 2003. Vol. 138. P. 1147-1155.

## REGULATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEMATOPOIETIC STEM CELL IN MRL-LPR/LPR MICE VIA INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS

Nataliya Aleksandrovna FEOFANOVA, Lyudmila Borisovna TOPORKOVA, Marina Aleksandrovna TIKHONOVA, Elena Removna CHERNYKH, Georgi Aleksandrovich NEVINSKY, Vladimir Aleksandrovich KOZLOV, Irina Anatol'evna ORLOVSKAYA

SI RI for clinical immunology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences  
14, Yadrintsevskaya str., Novosibirsk, 630099

Autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice carrying mutation in the lpr gene have defects in apoptosis of different cell types, in particular hematopoietic cells. To search the approaches for correction of functional activity of hematopoietic stem cells in MRL-lpr/lpr mice we used chemicals known to induce apoptosis: wortmannin (phosphoinositide 3-kinase inhibitor), rolipram (phosphodiesterase 4 inhibitor), H7 (protein kinase C inhibitor). All these chemicals enhanced apoptosis of CD34+ cells; rolipram and H7 tended to decrease the number of CD34+ cells in S/G2M phase. Incubation of bone marrow cells with all chemicals led to reduction of erythroid colonies number being increased in the aged MRL-lpr/lpr mice.

Feofanova N.A. — junior scientist, laboratory of immune biology of stem cell

Toporkova L.B. — candidate of Biological Sciences, senior researcher, laboratory of immune biology of stem cell

Tikhonova M.A. — candidate of Biological Sciences, senior researcher, laboratory of cellular immune therapy

Chernykh E.P. — doctor of Medical Sciences, professor, head of laboratory of cellular immune therapy

Nevinsky G.A. — doctor of Chemical Sciences, professor, head of laboratory of reparations enzymes

Kozlov V.A. — doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAMS, director

Orlovskaya A.I. — doctor of Medical Sciences, professor, head of laboratory of immune biology of stem cell,

e-mail: irorl@mail.ru