

УДК 616, 155, 194, 18 – 092.9 – 078, 33

Л. В. Сивакова, Е. А. Мамаева, П. В. Косарева, В. П. Хоринко

Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ПРИБРЕТЕННОЙ ТОКСИЧЕСКОЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Токсическая гемолитическая анемия, вызываемая лекарственными средствами и промышленными реагентами, обусловлена сочетанием различных патогенетических механизмов. Для ее моделирования был использован 2-бутоксизтанол, широко применяемый в химической промышленности реагент и сильный гемолитический яд. 2-бутоксизтанол вводили интраперитонеально нелинейным белым крысам. До эксперимента осуществляли забор крови для получения эритроцитарной массы. После 10-дневного наблюдения осуществляли постановку реакции агглютинации с аутологичными эритроцитами. При изучении показателей периферической крови было выявлено статистически значимое снижение уровня гемоглобина и количества эритроцитов, увеличение числа ретикулоцитов. При проведении реакции агглютинации присутствие антител к собственным эритроцитам выявлено как в группе с изолированным введением бутоксиэтанола, так и в группе с введением бутоксиэтанола в сочетании с острым холодовым стрессом, что говорит о развитии аутоиммунной реакции против собственных эритроцитов. При проведении реакции агглютинации с гетерологичными эритроцитами в группе контроля реакция была положительна со средними значениями $\log - 2,5 \pm 1,3$, что объясняется генетической идентичностью аутбредной популяции лабораторных крыс.

Ключевые слова: аутоиммунная гемолитическая анемия; 2-бутоксизтанол; гематотоксичность.

L. V. Sivakova, E. A. Mamaeva, P. V. Kosareva, V. P. Knorinko

Perm State Medical University named after academician E. A. Vagner, Perm, Russian Federation

IMMUNOLOGICAL PATHWAYS OF DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL ACQUIRED TOXIC HEMOLYTIC ANEMIA

Toxic hemolytic anemia, induced by drugs and industrial reagents, is provided by combination of different pathogenetic mechanisms. 2-butoxyethanol, a widely used in chemical industry reagent and strong hemolytic poison, was taken for modeling toxic hemolytic anemia. 2-butoxyethanol was injected to white nonlinear rats intraperitoneally. We were taken venous blood for erythrocyte suspension before the experiment. After 10 days we carried out serum agglutination test with autologous erythrocytes. In peripheral blood was found significant decreasing in hemoglobin level and reducing of red blood cells number, increasing in number of reticulocytes. In serum agglutination test was observed the presence of antibodies to own erythrocytes both in group with injection of 2-butoxyethanol and in group with injection of 2-butoxyethanol in combination with acute cold stress. It shows the development of autoimmune reaction to own red blood cells. In serum agglutination test with heterologous erythrocytes reaction was positive in control group with average values $\log - 2,5 \pm 1,3$. It is explained by genetical identity in outbred population of laboratory rats.

Key words: autoimmune hemolytic anemia; 2-butoxyethanol; haematotoxicity.

Введение

Гемолитическая анемия – это обширная группа заболеваний красной крови наследственного и приобретенного характера, основным признаком которых является выраженный гемолиз. Причины развития гемолиза весьма разнообразны: от врожденных энзимопатий до токсических воздействий и аутоиммунных нарушений. Это определяет гетерогенность механизмов развития болезни и, следова-

тельно, клинических проявлений и подходов к лечению [Hillman, Ault, Rinder, 2005].

В настоящее время большой интерес для исследования представляют токсические гемолитические анемии, вызванные воздействием различных промышленных реагентов и приемом лекарственных средств [Hematology, 2008]. Причины и пути развития гемолиза при данных интоксикациях исследованы не до конца. Разрешить спорные вопросы патогенеза токсических гемолитических анемий

позволяет экспериментальное моделирование. Для этой цели используется фенилгидразин – всесторонне исследованный экспериментально гемолитический яд, вызывающий выраженное снижение числа эритроцитов и гемоглобина, ретикулоцитоз и активирующий костно-мозговое кроветворение [Berger, 2007]. Также в качестве экспериментального гемолитического яда был предложен 2-бутоксизтанол (или бутилцеллозольв), широко используемый реагент, который применяется для органического синтеза, очистки металлов и в производстве лакокрасочных материалов и моющих средств. Было показано его гемолитическое действие на эритроциты человека *in vitro* [Ghanayem, Sullivan, 1993].

При введении гемолитических ядов в эксперименте поражение эритроцитов обусловлено различными механизмами. Гемолиз может развиваться непосредственно вследствие токсического воздействия вещества и опосредованно, через развитие аутоиммунных реакций против собственных эритроцитов [Garratty, Arndt, 2007; Johnson, Fueger, Gottschall, 2007; Garratty, 2009; Moreira-Rodrigues et al., 2010; El-Ashmawy, Gad, Salama, 2010]. Как правило, у этих пациентов отмечается положительный прямой антиглобулиновый тест: появление IgG или IgG и комплемента, в ряде случаев IgG, комплемента и IgA [Betensky et al., 2014; Bollotte et al., 2014; Haddad, Mohammad, Dai, 2014; Haley et al., 2014; Joybari et al., 2014].

Цель: изучение иммунологических механизмов развития приобретенной токсической гемолитической анемии при экспериментальном введении лабораторным животным 2-бутоксизтанола.

Материалы и методы

Исследования проводились на 40 нелинейных четырехмесячных крысах, весом 150-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария – свободный доступ к воде и пище, 12–14-часовой световой день, в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург) от 18.03.1986 г. (Текст изменен в соответствии с положениями Протокола (ETS № 170), после его вступления в силу 2 декабря 2005 г.; Лиссабонский договор о внесении изменений в Договор о Европейском союзе и Договор об учреждении Европейского сообщества вступили в силу 1 декабря 2009 г.) в ЦНИЛ ГОУ ВПО ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера.

Животные были разделены на две группы: первая (контрольная) содержалась в стандартных условиях вивария ($n = 20$), второй (опытной) вводи-

ли однократно интраперитонеально 2-бутоксизтанол в эмпирически выбранной дозе 20 мг/кг, выводили из эксперимента через 10 дней ($n = 20$).

До начала исследования у животных брали периферическую кровь в количестве 100 мкл – для получения эритромаксы, которую хранили при температуре +4°C с гемоконсервантом «Глюглицир» (Декстроза+Натрия цитрат; ОАО «Синтез»; Россия, г. Курган) из расчета 1 объем глюглицира к 4 объемам крови (согласно прилагаемой инструкции к препарату). По окончании исследований животных выводили из эксперимента путем перерезки спинного мозга под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии, брали материал для цитологического исследования – костный мозг из бедренной кости (для приготовления мазка). Осуществляли также взятие венозной крови для получения сыворотки и постановки реакции агглютинации с аутологичными эритроцитами, взятыми до эксперимента. Пробы инкубировали в течение 2 ч. при температуре +4°C и затем – в течение 30 мин. при температуре +37°C (для выявления действия тепловых и холодных антител). Результаты реакции оценивали общепринятым способом и выражали с учетом log-нормального распределения данных в виде log₂-обратных титров антител (Инструкция по применению диагностикума клещевого энцефалита сухого для РТГА, РСК, РРГ и РТНГА Минмедпрома СССР; 1990). Расчет log осуществляли при помощи таблицы log. Статистический анализ выполнен при помощи программного пакета Biostat и приложения Microsoft® Excel полнофункционального офисного пакета Microsoft Office 2007. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

При изучении показателей периферической крови животных после введения 2-бутоксизтанола было обнаружено статистически значимое снижение уровня гемоглобина (в контрольной группе 122.8±5.6 г/л, в опытной группе 84.0±5.2 г/л, $p < 0.05$) и количества эритроцитов (в контрольной группе $6.53 \pm 1.88 \times 10^9$ /мл, в опытной группе $4.56 \pm 0.15 \times 10^9$ /мл, $p < 0.05$) в сравнении с группой контроля. Было выявлено статистически значимое увеличение числа ретикулоцитов: в контрольной группе – 1.341±0.068%, в опытной группе – 4.022±0.464% ($p < 0.05$).

При проведении реакции агглютинации присутствие антител к собственным эритроцитам выявлено как в группе с изолированным введением бутоксиэтанола (средние значения log – 8.9±1.3), так и в группе с введением бутоксиэтанола в сочетании с острым холодным стрессом (средние зна-

чения $\log - 9.7 \pm 0.76$; $p=0.603$ критерий Стьюдента), то есть введение бутоксиэтанола провоцирует развитие аутоиммунной реакции, направленной в отношении собственных эритроцитов. При этом в группе с сочетанием введения бутоксиэтанола и острым стрессом агглютинация более выражена, но эта разница статистически незначима.

При проведении реакции агглютинации с гетерологичными эритроцитами в группе контроля реакция была положительна со средними значениями $\log - 2.5 \pm 1.3$.

В основе патогенеза приобретенной токсической гемолитической анемии лежат два механизма – окислительный и иммунный. Основу окислительного механизма составляет повреждение структур эритроцита различными окислителями. При избытке окислителя исчерпываются ресурсы антиоксидантной системы эритроцита (нарушение синтеза $NADPH_2$ в пентозном цикле при ингибировании или недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и, как следствие, угнетение системы глутатиона, основного антиоксиданта эритроцита), что приводит к усиленной продукции свободных радикалов внутри клетки. При этом возникает окислительная денатурация гемоглобина, перекисное окисление липидов мембраны и повреждение мембранных белков. Показателем нестойкости эритроцитов может быть проба осмотической резистентности – дефектные клетки лизируются при более низких содержаниях соли в растворе, чем нормальные эритроциты [Williams..., 2010].

При моделировании приобретенной токсической гемолитической анемии путем введения лабораторным животным фенолгидразина было показано, что поврежденные окислителем эритроциты удаляются из кровотока с помощью аутологичных антител. Данные антитела в норме способствуют удалению стареющих эритроцитов за счет связывания с измененными участками мембраны, на которых произошла десИАлизация, деградация или агрегация транспортных белков и нарушение фосфолипидной асимметрии. Также эти изменения могут распознаваться непосредственно макрофагами или опосредованно, через связывание комплекта или аутоантител. Подобный механизм элиминации поврежденных эритроцитов наблюдается у пациентов с дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [Horn, Bashan, Gopas, 1991]. Также аутологичные антитела могут образовывать агрегаты с денатурированным гемоглобином, вызывая изменения мембранных структур. Подобным образом элиминируются эритроциты у пациентов с серповидноклеточной анемией [Kannan, Laboyka, Low, 1988; Horn, Bashan, Gopas, 1991]. Было показано [Ghanayem, Sanchez, Matthews, 1992], что стареющие эритроциты более чувствительны к

действию 2-бутоксиэтанола. Исходя из этого, возможно предположить, что элиминация поврежденных 2-бутоксиэтанолом эритроцитов осуществляется с помощью нескольких механизмов.

Помимо окислительного механизма повреждения эритроцитов выделяют иммунный механизм повреждения. Выделяют несколько путей поражения эритроцитов при иммунной форме гемолитической анемии. Классификация механизмов вовлечения иммунной системы в патологический процесс основана на эффекторном механизме повреждения эритроцитов. Два из них (гаптенный и не-оантигенный) характеризуются выработкой антител против токсического вещества. При аутоиммунной форме продуцируются аутоиммунные антитела к антигенам эритроцита. В литературе описаны случаи выработки аутоантител к антигенам эритроцитов при приеме лекарственных средств, в частности α -метилдофы. Было показано, что данный препарат является сильным иммунорегулятором, который стимулирует выработку интерферона- γ Т-клетками (Th1-, NK-, NKT-клетками, цитотоксическими Т-лимфоцитами), усиливает синтез IgG В-клетками, пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, направляет дифференцировку Т-хелперов по пути Th1, снижает функции Т-супрессоров и вызывает продукцию антител против Rh-антигенов [Baier, Poehlau, 1994]. Однако по литературным данным, длительное поступление в организм 2-бутоксиэтанола не приводит к увеличению продукции антител, интерферонов и интерлейкина-2 [Ehon et al., 1991].

При проведении реакции агглютинации с гетерологичными эритроцитами в группе контроля реакция была положительна в половине случаев (средние значения $\log - 2.5 \pm 1.3$). Иммунологические исследования аутбредной линии лабораторных крыс показали, что особи в большинстве обладают генетической идентичностью и гомозиготностью, в частности имеют одну группу крови. Таким образом, можно объяснить отсутствие агглютинации эритроцитов [Baker, Lindsey, Weisbroth, 1979].

Выводы

1. При экспериментальном моделировании приобретенной токсической гемолитической анемии путем интраперитонеального введения животным 2-бутоксиэтанола отмечается появление аутоантител к эритроцитам; титр антител нарастает при сочетании введения 2-бутоксиэтанола и острого стресса.

2. Иммунологические исследования аутбредной популяции лабораторных крыс показали, что особи в большинстве обладают генетической идентичностью и гомозиготностью, в частности имеют одну группу крови.

Библиографический список

- Baier J.E., Poehlau D. Is alpha-methyl-dopa-type autoimmune hemolytic anemia mediated by interferon-gamma? // *Annals of Hematology*. 1994. Nov. Vol. 69(5). P. 249–251.
- Baker H.J., Lindsey J.R., Weisbroth S.H. *The Laboratory Rat*. New York: Academic Press, 1979. Vol. I: Biology and Disease. P. 55–57.
- Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity // *J. Appl. Biomed*. 2007. Vol. 5. P. 125–130.
- Betensky M. et al. Immune hemolytic anemia with drug-induced antibodies to carboplatin and vincristine in a pediatric patient with an optic pathway glioma // *Transfusion*. 2014. Vol. 54 (11) P. 2901–2905.
- Bollotte A. et al. Drug-induced hemolytic anemia: A retrospective study of 10 cases // *Rev. Med. Interne*. 2014. Vol. 35(12). P. 779–789.
- El-Ashrawy I.M., Gad S.B., Salama O.M. Grape seed extract prevents azathioprine toxicity in rats // *Phytother. Res*. 2010. Vol. 24(11). P. 1710–1715.
- Exon J.H. et al. Effects of subchronic exposure of rats to 2-methoxyethanol or 2-butoxyethanol: thymic atrophy and immunotoxicity // *Fundam. Appl. Toxicol*. 1991. May. Vol. 16 (4). P. 830–840.
- Garratty G. Drug-induced immune hemolytic anemia // *ASH Education Book January*. 2009. Vol. 1. P. 73–79.
- Garratty G., Arndt P.A. An update on drug-induced immune hemolytic anemia // *Immunohematology*. 2007. Vol. 23(3). P. 105–119.
- Ghanayem B.I., Sanchez I.M., Matthews H.B. Development of tolerance to 2-butoxyethanol-induced hemolytic anemia and studies to elucidate the underlying mechanisms // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1992. Feb. Vol. 112 (2). P. 198–206.
- Ghanayem B.I., Sullivan C.A. Assessment of the haemolytic activity of 2-butoxyethanol and its major metabolite, butoxyacetic acid, in various mammals including humans // *Hum. Exp. Toxicol*. 1993. Jul. Vol. 12 (4). P. 305–311.
- Haddad H., Mohammad F., Dai Q. Bendamustine-induced immune hemolytic anemia in a chronic lymphocytic leukemia patient: A case report and review of the literature // *Hematol. Oncol. Stem. Cell Ther*. 2014. Dec. Vol. 7(4). P. 162–164.
- Haley K.M. et al. Fatal carboplatin-induced immune hemolytic anemia in a child with a brain tumor // *J. Blood Med*. 2014. Vol. 15(5). P. 55–58.
- Hillman R.S., Ault K.A., Rinder H.M. *Hematology in Clinical Practice*. 4th Ed. 2005. P. 135–151.
- Hematology: basic principles and practice* / R. Hoffman et al. 5th ed. 2008. P. 645–659.
- Horn S., Bashan N., Gopas J. Phagocytosis of phenylhydrazine oxidized and G-6-PD-deficient red blood cells: the role of cell-bound immunoglobulins // *Blood*. 1991. Oct 1. Vol. 78 (7). P. 1818–1825.
- Johnson S.T., Fueger J.T., Gottschall J.L. One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia – a new paradigm // *Transfusion*. 2007. Vol. 47(4). P. 697–702.
- Joybari A.Y. et al. Oxaliplatin-induced renal tubular vacuolization // *Ann. Pharmacother*. 2014. Vol. 48(6). P. 796–800.
- Kannan R., Laboyka R., Low P.S. Isolation and characterization of the hemichrome-stabilized membrane protein aggregates from sickle erythrocytes. Major sites of autologous antibody binding // *J. Biol. Chem*. 1988. Vol. 263 (27). P. 13766–13773.
- Moreira-Rodrigues M. et al. Cardiac dysfunction in HgCl₂-induced nephrotic syndrome // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2010. Vol. 235 (3). P. 392–400.
- Williams Hematology* / Kaushansky K. et al. 8th Ed. 2010. P. 777–799.

References

- Baier J.E., Poehlau D. Is alpha-methyl-dopa-type autoimmune hemolytic anemia mediated by interferon-gamma? *Annals of Hematology*. 1994, Nov; 69(5): 249-51.
- Baker H.J., Lindsey J.R., Weisbroth S.H. *The Laboratory Rat, Volume I: Biology and Disease*. New York: Academic Press; 1979: 55-57.
- Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed*. 2007; 5: 125-30.
- Betensky M., Witmer C., Fisher M.J., Nance S., Weiss M.J., Sesok-Pizzini D.A. Immune hemolytic anemia with drug-induced antibodies to carboplatin and vincristine in a pediatric patient with an optic pathway glioma. *Transfusion*. 2014; 54 (11): 2901-2905.
- Bollotte A., Vial T., Bricca P., Bernard C., Broussolle C., Sève P. Drug-induced hemolytic anemia: A retrospective study of 10 cases. *Rev Med Interne*. 2014; 35(12): 779-89.
- El-Ashrawy I.M., Gad S.B., Salama O.M. Grape seed extract prevents azathioprine toxicity in rats. *Phytother Res*. 2010; 24(11): 1710-1715.
- Exon J.H., Mather G.G., Bussiere J.L., Olson D.P., Talcott P.A. Effects of subchronic exposure of rats to 2-methoxyethanol or 2-butoxyethanol: thymic atrophy and immunotoxicity. *Fundam Appl Toxicol*. 1991 May; 16 (4): 830-40.
- Garratty G., Arndt P.A. An update on drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology*. 2007; 23(3): 105-19.
- Garratty G. Drug-induced immune hemolytic anemia. *ASH Education Book January*. 2009; 1: 73-79.
- Ghanayem B.I., Sanchez I.M., Matthews H.B. Development of tolerance to 2-butoxyethanol-induced hemolytic anemia and studies to elucidate the un-

- derlying mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992 Feb; 112 (2): 198-206.
- Ghanayem B.I., Sullivan C.A. Assessment of the haemolytic activity of 2-butoxyethanol and its major metabolite, butoxyacetic acid, in various mammals including humans. *Hum Exp Toxicol.* 1993 Jul; 12 (4): 305-11.
- Haddad H., Mohammad F., Dai Q. Bendamustine-induced immune hemolytic anemia in a chronic lymphocytic leukemia patient: A case report and review of the literature. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2014 Dec; 7(4): 162-4.
- Haley K.M., Russell Th.B., Boshkov L., Leger R.M., Garratty G., Recht M. et al. Fatal carboplatin-induced immune hemolytic anemia in a child with a brain tumor. *J. Blood Med.* 2014; 15(5): 55-8.
- Hillman R.S., Ault K.A., Rinder H.M. Hematology in Clinical Practice, 4th Edition. 2005: 135-151.
- Hematology: basic principles and practice / R. Hoffman et al. 5th ed. 2008: pp. 645-659.
- Horn S., Bashan N., Gopas J. Phagocytosis of phenylhydrazine oxidized and G-6-PD-deficient red blood cells: the role of cell-bound immunoglobulins. *Blood.* 1991 Oct 1; 78 (7): 1818-25.
- Johnson S.T., Fueger J.T., Gottschall J.L. One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia - a new paradigm. *Transfusion.* 2007; 47(4): 697-702.
- Joybari A.Y., Sarbaz S., Azadeh P., Mirafsharieh S.A., Rahbari A., Farasatinasab M. et al. Oxaliplatin-induced renal tubular vacuolization. *Ann Pharmacother.* 2014; 48(6): 796-800.
- Kannan R., Laboyka R., Low P.S. Isolation and characterization of the hemichrome-stabilized membrane protein aggregates from sickle erythrocytes. Major sites of autologous antibody binding. *J. Biol. Chem.* 1988, 263 (27): 13766-73.
- Moreira-Rodrigues M., Henriques-Coelho T., Moura C., Vasques-Nóvoa F., Sampaio-Maia B., Pestana M. et al. Cardiac dysfunction in HgCl₂-induced nephrotic syndrome. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2010; 235 (3): 392-400.
- Williams Hematology / Kaushansky K. et al. 8th Edition. 2010: 777-799.

Поступила в редакцию 09.08.2016

Об авторах

Сивакова Людмила Владимировна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии, ст. преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии с курсом КЛД ГБОУ ВПО ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера, 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26

Мамаева Елизавета Андреевна, студентка лечебного факультета ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26; tearless.perm@gmail.com

Косарева Полина Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ, заведующая курсом КЛД, доцент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом КЛД ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26; perm-bagira@narod.ru

Хоринко Виталий Петрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26

About the authors

Sivakova Ludmila Vladimirovna, PhD, associate professor of Department of pathophysiology, senior lecturer of Department of microbiology, virology with the course of clinical laboratory diagnostics Perm State Medical University. 26, Petropavlovskaya str., Perm, Russia, 614990

Mamaeva Elisaveta Andreevna, student of medical faculty Perm State Medical University. 26, Petropavlovskaya str., Perm, Russia, 614990; tearless.perm@gmail.com

Kosareva Pauline Vladimirovna, PhD, MD, chief researcher of Central Research Laboratory, Department of morphological and pathophysiological studies, head of the course of clinical laboratory diagnostics, associate professor of Department of microbiology, virology with the course of clinical laboratory diagnostics Perm State Medical University. 26, Petropavlovskaya str., Perm, Russia, 614990; perm-bagira@narod.ru

Khorinko Vitalii Petrovich, PhD, senior researcher of Central Research Laboratory, Department of morphological and pathophysiological studies Perm State Medical University. 26, Petropavlovskaya str., Perm, Russia, 614990