

Т.В. Серебровська, І.С. Нікольський, Л.І. Тарануха, В.В. Нікольська,  
С.М. Галицька В.О.Іщук

## Вміст гемопоетичних стовбурових клітин у крові та особливості імунного статусу людей з різною стійкістю до гіпоксії

*Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) відіграють важливу роль у реакціях імунної системи на гіпоксію, забезпечуючи процеси репарації в тканинах організму, утворення всіх типів клітин крові тощо. Існують значні індивідуальні відмінності в здатності мобілізувати ГСК і клітини-попередники. Нами вивчено дію двотижневого інтервального гіпоксичного тренування (ІТ – вдихання 10 % O<sub>2</sub> по 5 хв 4 рази на день) на ГСК і основні гуморальні та клітинні компоненти імунітету в крові здорових людей віком від 25 до 35 років. Критерієм зниженої стійкості до гіпоксії було перевищення допустимих значень артеріального тиску крові, пульсу, хвилинної вентиляції легенів, сатурації крові та/або поява патологічних змін на ЕКГ під час гіпоксичного тесту (дихання 10 % киснем, 10 хв). Показано, що для людей з нормальною стійкістю до гіпоксії характерний більш високий вміст гемоглобіну, еритроцитів і ретикулоцитів в крові, знижена кількість лейкоцитів, лімфоцитів, CD8<sup>+</sup>-клітин, низький вміст імуноглобуліну А; спостерігався підвищений порівняно з особами зі зниженою стійкістю вміст комплекменту, індукована та резервна бактерицидність нейтрофілів у них також була значно більшою. Кількість ГСК CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup> у вихідному стані була приблизно однаковою в обох групах, але суб'єкти зі зниженою стійкістю реагували на ІТ двократним зниженням їх вмісту (у осіб з нормальною стійкістю достовірних змін не спостерігалось), більш вираженим підвищенням активності комплекменту та резервної бактерицидності нейтрофілів. Зниження циркулюючих ГСК, імовірно, пов'язано зі зміною їх міграційної здатності. Проте залишається незрозумілим, чи є це результатом пригнічення міграції ГСК у кровеносне русло або ж активацією виходу ГСК з нього. В обох випадках у тканинах накопичується більша кількість ГСК, що підвищує загальний регенеративний потенціал, який забезпечується їх здатністю до трансдиференціювання, пластичності та міжклітинної взаємодії. Вміст цитокінів еритропоєтину, фактора некрозу пухлин α (ФНП-α) та інтерферону γ (ІФН-γ) у вихідному стані був однаковий в обох групах, а вміст ІЛ-4 у суб'єктів з нормальною стійкістю до гіпоксії набагато перевищував такий у осіб зі зниженою стійкістю. ІТ різко знизило вміст прозапального цитокіну ФНП-α у всіх пацієнтів і в багато разів збільшило вміст ІЛ-4 в осіб зі зниженою стійкістю; спостерігалася тенденція до збільшення ІФН-γ у всіх суб'єктів дослідження. Концентрація еритропоєтину істотно не змінилася за час тренування. Отримані результати свідчать про можливість використання ІТ для імунотерапії, особливо для хворих зі зниженою стійкістю до гіпоксії.*

*Ключові слова: стовбурові клітини, інтервальна гіпоксія, індивідуальні особливості.*

### ВСТУП

Стійкість людей до будь-якого стресового чинника залежить від природної резистентності та реактивності організму. Активність імунної системи є чутливим показником цієї стійкості. Дія такого стресового фактора, як

гіпоксія супроводжується виразними змінами в роботі імунної системи, що в свою чергу значною мірою залежить від інтенсивності та тривалості впливу. Так, гостра тривала гіпоксія майже завжди спричинює метаболічні зміни, стрес і пригнічення імунної системи. А от розвиток адаптації до помір-

© Т.В. Серебровська, І.С. Нікольський, Л.І. Тарануха, В.В. Нікольська, С.М. Галицька В.О.Іщук

них періодичних гіпоксичних впливів може активувати неспецифічний імунний захист організму. Але глибинні механізми цих змін вивчені недостатньо. Зокрема, немає відомостей про роль циркулюючих гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у реакції організму на гіпоксію, хоча ці клітини відіграють вирішальну роль у становленні імунної системи, забезпечуючи, серед іншого, тимус своїми прогеніторами. Більше того, встановлено, що для диференціювання та проліферації ГСК обов'язковим елементом мікрооточення "ніш" є гіпоксія [17, 19]. Різний ступінь і час дії гіпоксичного впливу можуть мати важливе значення у продукції ГСК та їх циркуляції в кров'яному руслі. Транскрипційні фактори та цитокіни впливають на ці процеси. Нещодавні дослідження показали, що важливою сполучною ланкою між факторами, які беруть участь у регуляції поведінки стовбурових клітин і клітин-попередників, є фактор, індукований гіпоксією, який забезпечує молекулярну основу гіпоксичного контролю диференціації клітин і подальший їхній розвиток [24]. Деякі автори показали, що кровотворення поліпшується, якщо культивовані клітини піддаються впливу низьких концентрацій кисню [7, 10].

На жаль, свідчення про дію гіпоксії на ГСК людини вкрай обмежені [16]. Практично немає даних стосовно впливу інтервальної гіпоксії на циркулюючі ГСК людини. В дослідженні на моделях клітинних культур виявлено, що інтервальна гіпоксія при певній тривалості та інтенсивності є більш потужним тригером активації транскрипції, ніж постійна гіпоксія [21]. Змінюючи насиченість тканин киснем, можна, певно, впливати й на фізіологію ГСК.

Мета нашої роботи – вивчити вміст ГСК у циркуляторному руслі та особливості імунного статусу людей з різною стійкістю до гіпоксії при проведенні інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ).

## МЕТОДИКА

Обстежено 10 практично здорових чоловіків-добровольців віком від 25 до 35 років (маса

тіла  $76,2 \text{ кг} \pm 2,8 \text{ кг}$ , зріст  $176,9 \text{ см} \pm 1,8 \text{ см}$ ), у яких не було виявлено ознак патології серцево-судинної, дихальної, ендокринної, імунної та будь-яких інших систем і органів.

У літературі немає чітких критеріїв оцінки стійкості людини до гіпоксії. Найчастіше дослідники виходять з певних завдань дослідження. Так, в аерокосмічній медицині стійкими до гіпоксії вважають людей, у яких не розвиваються ознаки висотної хвороби на висоті 6000 м [6]. Виходячи з максимального споживання кисню, запропоновані градації різних рівнів здоров'я (тренуваності) [9]. Прямим методом визначення стійкості до гіпоксії в експерименті є підйом тварин у барокамері на «висоту» 11000 м та реєстрування часу появи першого агонального вдиху. При тестуванні людей проводять проби з диханням гіпоксичними газовими сумішами. Однак при її проведенні не так важлива стійкість до гіпоксії, скільки переносимість людиною процедури, яка залежить як від рівня функціонування кардіореспіраторної системи, так і психоемоційних характеристик.

Враховуючи те, що всі обстежені – молоді здорові люди, які не займалися спортом і не перебували в умовах високогір'я, для дослідження було вибрано гіпоксичний тест із диханням газовою сумішшю з 10 % кисню, що проводився до і після курсу ІГТ і тривав 10 хв. Він міг бути припинений передчасно при появі критеріїв непереносимості проби [4]. Стійкими до гіпоксії ми вважали осіб, у яких протягом 10 хв дихання гіпоксичною сумішшю не було значних відхилень основних фізіологічних показників: збільшення артеріального тиску та частоти серцевих скорочень більше ніж на 30 %, поява патологічних змін на ЕКГ, зниження в динаміці хвилинного об'єму дихання на 20 %, зниження парціального тиску кисню в артеріальній крові нижче ніж 40 мм рт. ст., що відповідає зниженню сатурації крові ( $\text{SaO}_2$ ) за пульсоксиметром нижче від 78–80 % [3]. Інші обстежені вважалися такими, що мають низьку стійкість до гіпоксії. За результатами проби всі чоловіки були умовно розділені на

дві групи. До I групи увійшли 5 осіб з низькою стійкістю до гіпоксії, у яких при диханні гіпоксичною сумішшю спостерігались одна або декілька вищезгаданих ознак, до II – 5 осіб з нормальною стійкістю до гіпоксії, котрі успішно пройшли пробу.

ІГТ проводили на апараті «Гіпокситрон» (Київ, Україна). Двотижневий цикл складався з чотирьох щоденних сеансів. Один сеанс включав дихання гіпоксичною сумішшю з 10 % кисню протягом 5 хв з такими самими інтервалами дихання атмосферним повітрям. Перед і після циклу ІГТ визначали фізичну працездатність за тестом з навантаженням на велоергометр до досягнення субмаксимальної частоти серцевих скорочень.

Для проведення імунологічних досліджень венозну кров брали до початку ІГТ та наступного дня після завершення курсу тренувань. Концентрацію гемоглобіну в периферичній крові визначали стандартним гемоглобінціанідним методом, число еритроцитів, ретикулоцитів, тромбоцитів і лейкоцитів – за допомогою рутинних методів мікроскопічного аналізу мазків крові. Кількість CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- та CD8<sup>+</sup>-клітин розраховували відповідно до стандартної технології прямої імуофлуоресценції [18] на приладі FACSAria™ (“Becton Dickinson & Co.”).

Фагоцитарну функцію нейтрофілів вивчали за здатністю поглинати клітини *Staphylococcus aureus* [2]. Бактерицидну активність нейтрофілів досліджували в тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [4].

Концентрацію IgM, IgG, IgA визначали методом радіальної імунодифузії, використовуючи моноспецифічні сироватки проти імуноглобулінів людини [15], циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) – методом преципітації в 3,75%-му поліетиленгліколі (ПЕГ-6000) з наступним фотометричним вимірюванням густини преципітату [13].

Активність комплементу в сироватці крові оцінювали за мінімальним об’ємом досліджуваної сироватки, необхідним для 100%-го лізису еритроцитів барана в гемолітичній системі.

Вміст цитокінів інтерферону  $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ), фактора некрозу пухлин (ФНП- $\alpha$ ), інтерлейкіну (ІЛ-4) у сироватці крові визначали за допомогою імуоферментного методу та наборів Biosours Human ELISA (США), еритропоетину – Biomerica ERO ELISA (США). Вимірювання здійснювали за оптичною густиною отриманого розчину з використанням фотометра для багатофункціонального аналізу SUNRISE (Австрія).

Для статистичного аналізу використовували критерії Стьюдента (t), Вілкоксона–Манна–Уїтні (U), знаків (z) і парний критерій Вілкоксона (T).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як можна побачити з табл. 1, за віком досліджені групи статистично не відрізнялися. Особи II групи мали більшу масу тіла та вищу фізичну працездатність, що можна пояснити більш розвинутою м’язовою системою. У них повільніше знижувалися значення SaO<sub>2</sub> та менше виражалось зниження на 6-й хвилині гіпоксичної проби, ніж у обстежених I групи. Проте саме в цій групі спостерігались найбільш виражені позитивні зміни реакції кардіореспіраторної системи на гіпоксичний тест після курсу ІГТ.

Як видно з табл. 2, для людей з нормальною стійкістю до гіпоксії характерним є суттєво вища концентрація гемоглобіну та гематокриту. Число еритроцитів і ретикулоцитів у їхній крові теж дещо вище, але статистично недостовірне. В осіб з низькою стійкістю до гіпоксії після тренувань відмічено підвищення числа тромбоцитів у межах фізіологічної норми, що може бути пов’язане зі стимулювальним впливом періодичної гіпоксії. Число лейкоцитів, лімфоцитів і CD8<sup>+</sup>-клітин у чоловіків II групи до гіпоксії, навпаки, суттєво менше. Причому у людей з нормальною стійкістю до гіпоксії зменшена і відносна, і абсолютна кількість лімфоцитів. Спостерігається тенденція до збільшення відносної кількості CD4<sup>+</sup>-клітини (42,9±2,6 порівняно 36,0 % ± 3,6 %, P>0,05). Найкраще

**Таблиця 1. Вік, антропометричні показники, фізична працездатність та сатурація крові (SaO<sub>2</sub>) при проведенні гіпоксичної проби у молодих людей з різною стійкістю до гіпоксії (M±m)**

Показники	Стійкість до гіпоксії	
	низька (n=5)	нормальна (n=5)
Вік, роки	31,5±2,2	27,8±1,8
Маса тіла, кг	69,0±5,5	77,3±4,4*
Зріст, м	173,5±5,3	175,3±2,7
Потужність субмаксимального фізичного навантаження, Вт	135,0±17,0	185,0±17,0*
Швидкість зниження і SaO <sub>2</sub> , %/хв	3,6±0,6	1,4±0,3*
SaO <sub>2</sub> на 6-й хвилині гіпоксичної проби	15,4±2,2	9,0±0,7*

\*P<0,05 порівняно з показниками у людей з низькою стійкістю до гіпоксії.

ці відмінності пояснюють Гаркаві та співавт. [1], які довели тісний кореляційний зв'язок між структурою лейкоцитарної формули периферичної крові та функціонуванням ендокринних залоз, станом гемокоагуляційної та центральної нервової систем. Зокрема, високе відносне число лімфоцитів (більше ніж 40 %) є ознакою напруженого функціонування організму, так званої „переактивації”.

Слід також зазначити, що всі вказані відмінності у кількості різних типів клітин притаманні обстеженим як до проведення ІГТ, так і після нього.

Кількість клітин CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup> у людей з різною стійкістю до гіпоксії приблизно однакова, але пацієнти з низькою стійкістю реагують на ІГТ суттєвим їх зменшенням (табл. 3). Це свідчить про те, що отримані нами раніше дані [20] про зниження кількості CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>-клітин при ІГТ у групі пацієнтів у цілому, сформувалися за рахунок тих, що мають низьку стійкість до гіпоксії.

Зниження циркулюючих ГСК, імовірно, пов'язано зі зміною їхньої міграційної здатності. Проте незрозуміло, чи є це результатом пригнічення міграції ГСК у кровоносне

**Таблиця 2. Гематокрит, вміст гемоглобіну, число еритроцитів, ретикулоцитів, тромбоцитів та різних типів лейкоцитів в периферичній крові обстежених осіб (M±m)**

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
Гемоглобін, г/л	134,6±5,5	140,8±6,5	159,6±1,9*	159,0±2,3*
Гематокрит, %	41,4±2,9	42,8±0,9	49,2±2,7*	50,4±1,0*
Еритроцити, ×10 <sup>6</sup> /мл	4,5±0,3	4,2±0,2	4,7±0,2	4,7±0,3
Ретикулоцити, %	1,18±0,29	1,36±0,15	1,32±0,20	1,16±0,16
Тромбоцити, ×10 <sup>3</sup> /мкл	120±30	170±10**	150±20	170±10
Лейкоцити, мкл	6780±230	5500±550	5240±640*	5630±330
Лімфоцити, %	38,4±4,6	38,0±7,8	31,2±3,0	26,8±4,2
Лімфоцити, мкл	2570±260	1940±250	1640±240*	1490±200*
CD4 <sup>+</sup> -клітини, %	36,0±3,6	39,8±4,5	42,9±2,6	41,5±3,5
CD8 <sup>+</sup> -клітини, мкл	650±40	530±90	380±70*	320±30*

Примітка. Тут і в табл. 3–6: \*P<0,05 порівняно з показниками у людей з низькою стійкістю до гіпоксії;

\*\* P<0,05 вірогідність різниці показників до та після інтервального гіпоксичного тренування

Таблиця 3. Вміст CD45+34+-клітин у периферичній крові обстежених осіб (M±m)

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
CD45+34+-клітини, %	0,028±0,003	0,017±0,002**	0,031±0,006	0,036±0,006*
CD45+34+-клітини, мкл	1,833±0,285	0,980±0,190**	1,493±0,226	2,021±0,321*

русло або ж активацією виходу цих клітин з нього. В обох випадках у тканинах накопичується більша кількість ГСК, що підвищує загальний регенеративний потенціал, який забезпечується здатністю ГСК до трансдиференціювання, пластичності та міжклітинної взаємодії.

Поодинокі літературні дані вказують на те, що перебування в середовищі гіпоксії може збільшити кількість стовбурових клітин. За даними Theiss та співавт. [22], однотижневе перебування в середньогір'ї (висота 1700 м) з фізичною активністю підвищує вміст циркулюючих клітин-попередників у здорових дорослих. Ciulla та співавт. [8] повідомили про збільшення клітин-попередників ендотелію й ендотеліальних колонієутворювальних факторів у здорової людини після походу в Гімалаї. Але в іншому дослідженні у здорових дорослих [16] виявлено зниження циркулюючих ГСК, ендотеліальних клітин і клітин-попередників після 12 діб знаходження на висоті 3000 м. Viscog та співавт. [23] повідомили, що після трьох діб підряд експозиції протягом 3 год при барометричному

тиску 405 мм рт. ст. (відповідає висоті 5000 м) не було помітних змін у кількості циркулюючих лейкоцитів або CD34+-клітин. Таким чином, щодо впливу постійної або тривалої переривчастої гіпоксії на циркулюючі ГСК дані літератури суперечливі.

Вміст ЦІК достовірно не відрізнявся у осіб з обох груп як у вихідному стані, так і після курсу ІГТ (табл. 4). Активність комплекменту у пацієнтів I групи значно знижена, вона суттєво підвищується під впливом гіпоксичного тренування і дорівнює такій, що визначається у людей, стійких до гіпоксії, після ІГТ. Таким чином, більш низький рівень комплекменту сполучається з низькою стійкістю до гіпоксії, але вирішальне значення цього показника є в тому, що його активність значно підвищується в результаті ІГТ. Можна вважати, що така направленість реакції на ІГТ може відігравати позитивну роль у підвищенні неспецифічної стійкості організму до ендо- та екзогенних факторів.

Вміст IgA в сироватці крові людей II групи суттєво нижче, він не змінюється після ІГТ, але залишається значно зниженим

Таблиця 4. Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), імуноглобулінів різних класів і комплекменту в сироватці крові обстежених осіб (M±m)

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
ЦІК (од.опт.густ.)	40,2±4,8	35,9±3,9	36,1±4,9	29,7±1,9
Комплемент, мл	0,078±0,021	0,032±0,005**	0,040±0,006	0,032±0,005**
Імуноглобуліни, г/л				
G	14,93±2,08	12,05±0,96	10,48±1,14	11,90±1,80
M	1,43±0,20	1,60±0,37	1,29±0,08	1,29±0,12
A	2,82±0,43	2,67±0,41	2,04±0,26*	1,88±0,24*

порівняно з пацієнтами I групи. Слід зазначити, що незалежно від реакції на ІГТ, у пацієнтів з нормальною стійкістю до гіпоксії, крім статистично встановленого зменшеного рівня показників, можна помітити тенденцію до зменшеного вмісту IgM, IgG, ЦІК і комплекменту.

Слід відмітити, що поглинальна активність і спонтанна бактерицидність нейтрофілів майже однакові в обох групах і не змінюються після гіпоксичного тренування (табл. 5). Індукована та резервна бактерицидність нейтрофілів суттєво нижча в людей I групи і стає достовірно вищою після ІГТ. У пацієнтів II групи ці показники практично не змінюються. Тому складається враження, що їх підвищення у людей I групи під впливом ІГТ може поліпшити їх стійкість до гіпоксії.

Міграцію ГСК кровотворної тканини до периферичного кровообігу регулюють хемокіни та цитокіни [14]. Wang та співавт. [24] повідомили, що важка в порівнянні з помірною переривчаста гіпоксія викликає різноспрямовані зміни концентрації інтерлейкінів у плазмі. Серед основних імунорегуляторних функцій ІФН є можливість збільшення активності природних клітин-кілерів, що є істотною частиною механізму раннього захисту від інфекцій або розвитку пухлини [11]. ФНП- $\alpha$  і цитокіни, що утворюються при інфекції, травмі або втручаннях, виявилися ключовими у запуску смертельних наслідків септичного шоку, кахексії й інших системних проявів захворювання.

У нашому дослідженні визначення вмісту цитокінів у сироватці крові обстежених показало, що у вихідному стані кількість ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$  та еритропоєтину у людей обох груп вірогідно не розрізняється (табл. 6). Але спостерігається тенденція до підвищення ФНП- $\alpha$  у людей II групи порівняно з I удвічі. Причому в результаті ІГТ вміст фактора знижується в обох групах десь у 5–15 разів, що при подальших дослідженнях може підтвердити роль цього провідного цитокіну у реакції на ІГТ людей як з низькою, так і з нормальною стійкістю до гіпоксії.

Важливими є також результати, отримані відносно ІЛ-4. Слід відмітити, що вихідне значення ІЛ-4 у обстежених I групи майже у 300 разів менше, ніж у пацієнтів II групи. Як відомо, основними джерелами ІЛ-4 є Т-хелпери 2-го типу [12]. Можна припустити, що в осіб I групи їхня функціональна активність знижена. А от реакція ІЛ-4 на ІГТ в цих групах є різнонаправленою. Якщо у людей I групи вміст ІЛ-4 починає підтягуватися до рівня II групи, то в останній він змінюється у протилежний бік, тобто зменшується. І таким чином концентрація ІЛ-4 стає приблизно однаковою у обстежених обох груп. Не виключено, що така ситуація може бути прикладом регуляторної відповіді гомеостатичного характеру, коли направленість реакції на діючий чинник визначається вихідним значенням досліджуваного показника.

Отже, наведені результати показують, що нормальна стійкість до гіпоксії насамперед

**Таблиця 5. Поглинальна та бактерицидна активність (%) нейтрофілів периферичної крові обстежених осіб (M $\pm$ m)**

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
Поглинальна активність	66,6 $\pm$ 5,0	64,4 $\pm$ 5,0	64,4 $\pm$ 1,5	68,4 $\pm$ 2,8
Бактерицидність				
спонтанна	13,8 $\pm$ 1,8	12,2 $\pm$ 2,4	11,4 $\pm$ 2,7	15,6 $\pm$ 1,5
індукована	19,2 $\pm$ 3,0	27,4 $\pm$ 3,4	31,8 $\pm$ 4,5*	39,0 $\pm$ 5,4*
резервна	5,4 $\pm$ 1,5	15,2 $\pm$ 4,4**	20,4 $\pm$ 2,8*	25,4 $\pm$ 3,1*

Таблиця 6. Вміст фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ), інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), інтерферону  $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ) та еритропоєтину в сироватці крові обстежених осіб (M $\pm$ m)

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
ФНП- $\alpha$ , пг/мл	0,73 $\pm$ 0,34	0,13 $\pm$ 0,03**	1,53 $\pm$ 0,53	0,10 $\pm$ 0,01**
ІЛ-4, пг/мл	0,03 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,41**	2,57 $\pm$ 1,57*	0,50 $\pm$ 0,30
Еритропоєтин, МО/мл	7,98 $\pm$ 1,46	9,23 $\pm$ 2,14	7,68 $\pm$ 1,74	6,31 $\pm$ 1,02
ІФН- $\gamma$ , пг/мл	6,57 $\pm$ 1,29	7,06 $\pm$ 1,56	5,11 $\pm$ 2,05	5,60 $\pm$ 1,44

може бути зумовлена кращим станом червоної крові у цих пацієнтів. Але людям з нормальною стійкістю до гіпоксії притаманний і особливий імунний статус як природженого, так і набутого імунітету, що ставить питання про механізми зв'язку кисневого забезпечення організму з функціонуванням окремих ланок імунної системи.

Наші попередні дослідження на моно- та дизиготних близнюках показали, що стійкість до гіпоксії є природженою конституційною ознакою [5]. Але, з іншого боку, орієнтуючись на суттєві зміни імунного статусу під впливом ІГТ, можна думати, що більшість показників активності імунної системи функціонально залежні та формуються в тісному зв'язку з варіантами відповіді на кисневе забезпечення. Якщо підвищення рівня комплементу і резервної бактерицидності у людей з низькою стійкістю до гіпоксії під впливом ІГТ можна практично однозначно розглядати як свідчення підвищення їх гіпоксичної стійкості й антиінфекційної резистентності безпосередньо на момент визначення, то зменшене у таких людей число лейкоцитів за рахунок лімфоцитів і CD8<sup>+</sup>-клітин, а також ІgA вказує на їх антиінфекційну резистентність.

Як може сполучатися підвищена стійкість до гіпоксії зі зниженими показниками імунного статусу? Насамперед треба пригадати, що стрес, який обов'язково включає лімфопенію як компонент реакції, призводить до підвищення й антигіпоксичної, й антиінфекційної резистентності. Механізми підвищення останньої за таких обставин майже невідомі. Одним із них може бути зниження

кількості CD8<sup>+</sup>-клітин з супресорною активністю внаслідок парціального збільшення кількості CD8<sup>+</sup>-цитотоксичних лімфоцитів, і іншим – механізм ослаблення супресорного контролю за синтезом антитіл через зниження загальної концентрації імуноглобулінів і порушення зворотного зв'язку в системі.

Двократне зменшення кількості циркулюючих ГСК під впливом ІГТ у людей з низькою стійкістю до гіпоксії може свідчити про те, що саме у них ця реакція, як і інші (підвищення рівня комплементу та спонтанної бактерицидності) необхідні для адаптування до гіпоксії. Можна припустити, що депонування при розвитку гіпоксії ГСК, які на цей момент не виконують функції ефекторних клітин, в тканинах, згодом вияляється необхідним резервом завдяки реалізації поповнених репаративних можливостей.

## ВИСНОВКИ

1. Для людей з нормальною стійкістю до гіпоксії характерним є суттєво вищий порівняно з людьми зі зниженою стійкістю вміст гемоглобіну та гематокрит, дещо вища кількість еритроцитів і ретикулоцитів, що загалом свідчить про кращий стан червоної крові.

2. У пацієнтів з нормальною стійкістю до гіпоксії зменшені кількість лейкоцитів, лімфоцитів, CD8<sup>+</sup>-клітин і вміст ІgA, індукована та резервна бактерицидність нейтрофілів суттєво більша.

3. Кількість CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>-клітин у крові людей обох груп приблизно однакова, але пацієнти з низькою стійкістю до гіпоксії ре-

агують на ІГТ зменшенням їх удвічі.

4. Пацієнти з низькою стійкістю до гіпоксії реагують на ІГТ збільшенням активності комплементу і резервної бактерицидності нейтрофілів.

**Т.В. Серебровская, И.С. Никольский,  
Л.И. Тарануха, В.В. Никольская,  
С.М. Галицкая, В.А. Ишчук**

### **СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КРОВИ И ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ЛЮДЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ**

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) играют важную роль в реакциях иммунной системы на гипоксию, обеспечивая процессы репарации в тканях организма, образование всех типов клеток крови и др. Существуют значительные индивидуальные отличия в способности мобилизовать ГСК и клетки-предшественники. Нами изучено воздействие двухнедельной интервальной гипоксической тренировки (ИГТ – вдыхание 10 % O<sub>2</sub> по 5 мин 4 раза в день) на ГСК и основные гуморальные и клеточные компоненты иммунитета в крови здоровых обследованных 25–35 лет. Критерием сниженной устойчивости к гипоксии было превышение допустимых значений артериального давления крови, пульса, минутной вентиляции легких, SaO<sub>2</sub> и/или появление патологических изменений на ЭКГ во время гипоксического теста (дыхание 10% O<sub>2</sub>, 10 мин). Показано, что для людей с нормальной устойчивостью к гипоксии характерно более высокое содержание гемоглобина, эритроцитов и ретикулоцитов в крови, сниженное количество лейкоцитов, лимфоцитов, CD8<sup>+</sup>-клеток, низкое содержание IgA; наблюдалась повышенная по сравнению с субъектами со сниженной устойчивостью к гипоксии активность комплемента, индуцированная и резервная бактерицидность нейтрофилов была также значительно больше. Количество ГСК CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>-клеток в исходном состоянии примерно одинаково в обеих группах, но люди со сниженной устойчивостью реагируют на ИГТ существенным двукратным уменьшением их содержания (у обследованных с нормальной устойчивостью достоверных изменений не наблюдалось), более выраженным повышением активности комплемента и резервной бактерицидности нейтрофилов. Снижение циркулирующих ГСК, вероятно, связано с изменением их миграционной способности. Однако остается неясным, является ли это результатом угнетения миграции ГСК в кровеносное русло или же активацией их удаления из него. В обоих случаях в тканях будет накапливаться большее число этих клеток, что увеличивает общий регенеративный потенциал, который обеспечивается способностью ГСК к трансдифференцировке, пластичности и межклеточному взаимодействию.

Содержание цитокинов эритропоэтина, ФНП-α и ИНФ-γ было одинаково в обеих группах в исходном состоянии, а уровень ИЛ-4 у субъектов с нормальной устойчивостью к гипоксии многократно превышал таковой у людей со сниженной устойчивостью. ИГТ резко снизила содержание провоспалительного цитокина ФНП-α у всех пациентов и многократно увеличила ИЛ-4 в группе со сниженной устойчивостью; наблюдалась тенденция к увеличению ИНФ-γ у всех обследованных. Концентрация эритропоэтина существенно не изменялась за время исследования. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования ИГТ для иммунотерапии, особенно для больных со сниженной устойчивостью к гипоксии.

Ключевые слова: стволовые клетки, интервальная гипоксия, индивидуальные особенности.

**T.V. Serebrovskaya, I.S. Nikolsky, L.I. Taranukha,  
V.V. Nikolska, S.M. Galytska, V.A. Ishchuk**

### **HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND IMMUNE STATUS OF SUBJECTS WITH DIFFERENT HYPOXIC TOLERANCE**

Intermittent hypoxia treatment (IHT) is gaining attention as a clinical modality due to its capacity to protect cells, tissues, organs, and the whole organism from more intense and/or sustained hypoxia, ischemia and other stresses, to enhance physical and mental capacity. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) play an important role in immune response to hypoxia ensuring tissue reparation processes, formation of all types of blood cells etc. There exist considerable individual differences in the capability to mobilize HSPC. This study was designed to compare the effects of IHT on HSPC, various factors of natural resistance and main humoral and cellular components of adaptive immunity in peripheral blood of subjects with normal and reduced tolerance to hypoxic load. Ten healthy male volunteers (age 30,9±0,6 y.o.) participated in the study and were divided into two groups with reduced (RT, 5 subjects) and normal (NT, 5 subjects) hypoxic tolerance. Criterion for reduced hypoxic tolerance detection was the exceeding deviation of arterial blood pressure, minute ventilation, SaO<sub>2</sub> and/or pathological changes in ECG during sustained hypoxia test (breathing with 10% oxygen, 10 min). All subjects were studied before and after a 14 day IHT program consisting of four 5 min bouts/d of breathing 10% O<sub>2</sub>, with intervening 5 min room air exposures. Immunofluorescence detected HSPCs as CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> cells in peripheral blood. Phagocytic and bactericidal activities of neutrophils, circulating immunoglobulins (IgM, IgG, IgA), immune complexes, complement, and cytokines (EPO, TNF-α, IL-4, IFN-γ) were measured. It was shown that NT subjects had higher hemoglobin and erythrocytes level, hematocrit and physical working capacity, but leukocytes, lymphocytes, CD8<sup>+</sup>-cells contents and level of IgA were lower than in RT. These differences were preserved after IHT course. CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>cells content was the same in both groups before IHT, but RT subjects demonstrated twice decrease in HSPCs



content after IHT as opposed to NT who did not show distinct reactions. A decrease in HSPCs is probably associated with the change of their migration capacity. However, it remains unclear whether there is an inhibition of HSPCs migration into circulation or an activation of HSPCs escape from circulation. In both cases tissues could accumulate more HSPCs which in turn could enhance hematopoiesis and general regenerative potential. RT group also had lower complement, induced and reserve bactericidal activities of neutrophils which were significantly increased after IHT reaching the level of NT. The level of cytokines EPO, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  did not differ in both groups before IHT but considerably reduced level of IL-4 was registered in RN patients. IHT sharply lowered pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in both groups, significantly increased IL-4 in RT subjects; increasing behavior of IFN- $\gamma$  was observed in both groups. EPO was not affected considerably during the study. The findings support the potential for eventual application of IHT for immunotherapy, especially for patients with reduced hypoxic tolerance.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
Institute of Genetic and Regenerative Medicine, Academy of Medical Sciences, Kyiv, Ukraine;  
State Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences, Kyiv, Ukraine*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гаркави Л.Х., Квакина В.Б., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия. – М.: Имедис, 1998. – 565 с.
2. Дуглас С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике. – М.: Медицина, 1983. – 193 с.
3. Коркушко О.В., Серебровська Т.В., Шатило В.Б., Ішук В.О., Лопата В.О. Вибір оптимальних режимів для проведення інтервальних нормабаричних гіпоксичних тренувань у медичній практиці та спортивній медицині: Метод. рекомендації. – К., 2010. – 30 с.
4. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. – Новосибирск: Наука, 1983. – 343 с.
5. Серебровская Т.В. Оценка степени генетической обусловленности реакций кардио-респираторной системы человека на гипоксию и гиперкапнию // Косм. биология и авиакосм. медицина. – 1982. – **16**, №6. – С. 54–58.
6. Ушаков И.Б., Усов В.М., Дворников М.В., Бухтияров И.В. Современные аспекты проблемы гипоксии в теории и практике высотной физиологии и авиационной медицины. – В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. – М.; Воронеж: Истоки, 2004. – С. 170–200.
7. Cipolleschi M.G., Dello Sbarba P., Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells // Blood. – 1993. – **82**. – P. 2031–2037.
8. Ciulla M.M., Giorgetti A., Lazzari L., Cortiana M., Silvestris I., Annoni G., De Asmundis C., Fiore A.V., Montelatici E., Paliotti R., Magrini F., Rebullia P., Cortelezzi A. High-altitude trekking in the Himalayas increases the activity of circulating endothelial cells // Amer. J. Hematol. – 2005. – **79**. – P. 76–78.
9. Cooper K.H. The new aerobics. M. Evans and Company, Inc., 1970. – 192 p.
10. Danet G.H., Pan Y., Luongo J.L., Bonnet D.A., Simon M.C. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions // J. Clin. Invest. – 2003. – **112**. – P. 126–135.
11. Djeu J.Y., Stocks N., Zoon K., Stanton G.J., Timonen T., Herberman R.B. Positive self regulation of cytotoxicity in human natural killer cells by production of interferon upon exposure to influenza and herpes viruses // J. Exp. Med. – 1982. – **156**. – P. 1222–1234.
12. Gilmour J., Lavender P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells // Immunology. – 2008. – **124**. – P. 437–444.
13. Haskova V., Kaslik L., Malejerwa M. A new method of the determination of the circulating immune complexes in liquor (in Russian) // Gasopis Lekaru Ceskych. – 1977. **116** (14). – P. 436–437.
14. Krstić A., Vlaski M., Hammoud M., Chevaleyre J., Duchez P., Jovčić G., Bugarski D., Milenković P., Bourin P., Boiron J.M., Praloran V., Ivanović Z. Low O<sub>2</sub> concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34+ and mesenchymal stem cells // Eur Cytokine Netw. – 2009. – **20**. – P. 10–16.
15. Manchini G., Vaerman J.-P., Carbonera A.O., Heremans J.F. A simple radial-diffusion method for the immunological quantitation of protein. – In: Proceedings of the biological fluids. – Amsterdam, London, N.Y.: Elsevier, 1964. – P. 370–379.
16. Mancuso P., Peccatori F., Rocca A., Calleri A., Antoniotti P., Rabascio C., Saronni L., Zorzino L., Sandri M.T., Zubani A., Bertolini F. Circulating endothelial cell number and viability are reduced by exposure to high altitude // Endothelium. – 2008. – **15**. – P. 53–58.
17. Nikolsky I., Serebrovska T.V. Role of hypoxia in stem cell development and functioning. Review // Фізіол. журн. – 2009. – **55**, № 4. – С. 116–130.
18. Ojeda-uribe M., Sovalat H., Bourderont D., Brunot A., Marr A., Levwandowski H., Chaboute V., Peter P., Henon P. Peripheral blood and BM CD34+ CD38-cells show better resistance to cryopreservation than CD34+ CD38+ cells in autologous stem cell transplantation // Cytotherapy. – 2004. – **6**, № 6. – P.571–583.
19. Olive P.L., Luo C.M., Banath J.P. Local hypoxia is produced at sites of intratumour injection // Brit. J. Cancer. – 2002. – **86**. – P. 429–435.
20. Serebrovska T., Nikolsky I., Ishchuk V. Human adaptation to intermittent hypoxia: effects on hematopoietic stem cells and immune function. – In: Adaptation Biology and Medicine, Vol. 6: Cell Adaptations and Challenges, Eds: P.Wang, C.-H. Kuo, N.Takeda and P.K.Singal, Canada: Narosa Publisher. – 2010. – P. 181–191.

21. Tang Y.L., Zhu W., Cheng M., Chen L., Zhang J., Sun T., Kishore R., Phillips M.I., Losordo D.W., Qin G. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression // *Circulat. Res.* – 2009. – **104**. – P. 1209–1216.
22. Theiss H.D., Adam M., Greie S., Schobersberger W., Humpeler E., Franz W.M. Increased levels of circulating progenitor cells after 1-week sojourn at moderate altitude (Austrian Moderate Altitude Study II, AMAS II) // *Respirat Physiol Neurobiol.* – 2008. – **160**. – P. 232–238.
23. Viscor G., Javierre C., Pagès T., Ventura J.L., Ricart A., Martin-Henaó G., Azqueta C., Segura R. Combined intermittent hypoxia and surface muscle electrostimulation as a method to increase peripheral blood progenitor cell concentration // *J. Transl Med.* – 2009. – **7**. – P. 91.
24. Wang J.S., Lin H.Y., Cheng M.L., Wong M.K. Chronic intermittent hypoxia modulates eosinophil- and neutrophil-platelet aggregation and inflammatory cytokine secretion caused by strenuous exercise in men // *J. Appl. Physiol.* – 2007. – **103**. – P. 305–314.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Ин-т генет. і регенерат. медицини НАМН України, Київ;  
Ин-т геронтології НАМН України, Київ  
E-mail: sereb@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 02.12.2011*