

# Корекція кістковомозкового синдрому у опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин

К.І. Нікольська, Г.М. Бутенко

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ,  
e-mail: nikolskaya.kiev@gmail.com

*Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) і прогеніторів, представлених у препаратах клітин кісткового мозку (ККМ) і фетальної печінки (КФП), позитивно позначалася на показниках імунної системи летально опромінених мишей, гальмуючи розвиток кістковомозкового синдрому: суттєво збільшувалася маса та клітинність тимуса і кісткового мозку, а також зростала здатність стромальних клітин кісткового мозку до утворення фібробластних колоній. Значно підвищувалася природна цитотоксична і проліферативна активність лімфоцитів. Попередня інкубація з мультипотентними стромальними клітинами (МСК) тимуса ККМ призводила до суттєвого зростання імунологічних показників: збільшення на 35 % клітинності селезінки і на 20 % числа лімфоцитів у периферичній крові, стимуляції на 17 % природної цитотоксичності, на 47 % проліферативної активності Т-лімфоцитів, в 2,8 раза синтезу  $\alpha/\beta$ - і в 1,7 раза  $\gamma$ -інтерферонів, підвищення на 50 % вмісту спонтанного фактора некрозу пухлин  $\alpha$  і активації антитілоутворення в 2,8 раза. Індуковані МСК тимуса КФП за деякими параметрами проявляли значно більшу активність: підвищення в 10,3 раза маси і в 6,8 раза клітинності тимуса, на 52 % кількості лімфоцитів, стимуляції на 69 % природної цитотоксичності, в 1,8 раза синтезу  $\alpha/\beta$ - і в 2,9 раза  $\gamma$ -інтерферонів, активації антитілоутворення в 2,7 раза. Дія ККМ і КФП іноді розрізнялася у кількісному відношенні, але завжди була однонаправленою. Результати можуть бути використані для розробки методів підвищення регенеративної і радіозахисної активності трансплантатів ГСК.*

*Ключові слова: радіаційний імунодефіцит; регенерація; гемопоетичні стовбурові клітини; мультипотентні стромальні клітини; міжклітинна взаємодія; трансплантація.*

## ВСТУП

Проблема регенерації імунної системи в імунопатології є однією з основних. Корекція імунітету потрібна для терапії первинних імунодефіцитів і при лікуванні захворювань, які маніфестуються синдромами набутої імунологічної недостатності: інфекційним, аутоімунним, алергічним і лімфопроліферативним. Велика потреба в ефективних методах регенерації імунної системи існує і при розвитку її недостатності в результаті дії радіаційних, хіміо-терапевтичних факторів і шкідливих чинників навколишнього середовища [1].

Нині одним з найбільш перспективних

напрямків є розробка методів регенерації імунної системи на основі використання стовбурових клітин. Оскільки всі клітини адаптивного і більшість природного імунітету походять із гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) і їх мультипотентних прогеніторів, які мають ознаки початкового диференціювання, саме вони вважаються необхідним первинним джерелом для регенерації і з успіхом уже досить тривалий час застосовуються, особливо в онкогематології. Але є ціла низка з вищезазначених патологічних процесів, коли ефективність трансплантації ГСК не достатньо задовільна. Постало питання про підвищення її ефективності. В роботі, що пропонується,

© К.І. Нікольська, Г.М. Бутенко

вивчається можливість стимуляції регенеративної активності ГСК за допомогою їх преінкубації з мультипотентними стромальними клітинами (МСК) тимуса, котрі, як і МСК кісткового мозку, здійснюють головну підтримку ГСК у фізіологічних умовах через контактну взаємодію [2,3] і при регенерації [4]. МСК тимуса можуть мати певну перевагу над МСК іншого походження, тому що вони мають найвищу мембранну спорідненість до незрілих тимусзалежних клітин, а також беруть участь у морфогенезі і функціонуванні «дорослого» тимуса [5]. На ці обставини і зважали при плануванні досліджень про вплив на функціональну активність ГСК і прогеніторів їх контакту з МСК тимуса.

Використана класична модель імунологічної патології – кісткомозковий синдром, який спричиняється летальним опроміненням, що призводить до спустошення кісткового мозку, органів імунної системи і зумовлює розвиток опортуністичного інфекційного процесу кишкового походження з летальним його закінченням. Персистуючі вірусні інфекції є важливим фактором па-

тогенезу віддалених наслідків Чорнобильської катастрофи [6]. Пригнічення швидкості реалізації патогенезу захворювання і глибини уражень організму можливе тільки в результаті ефективного відновлення імунної системи, що призводить і до підвищення виживаності після опромінення. Такий результат і є критерієм ефективності регенерації.

Метою нашої роботи було вивчити вплив сингенної трансплантації преінкубованих з МСК тимуса клітинних препаратів ГСК і прогеніторів, які знаходяться серед клітин кісткового мозку (ККМ) і фетальної печінки (КФП) на загальний стан імунної системи, відновлення клітинного і гуморального імунітету, природного і адаптивного.

### МЕТОДИКА

Перш за все для виконання дослідження була розроблена відповідна експериментальна модель (див. рис. 1). Тварин опромінювали одноразово за допомогою установки «Тера-трон» з радіонуклідним джерелом  $Co_{60}$ . Доза опромінення становила 9,0 Гр, потужність дози - 151 сГр/хв. Всі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриман-



Рис.1. Схема вивчення впливу контактної взаємодії мультипотентних стромальних клітин тимуса з гемопоетичними стовбуровими клітинами і прогеніторами мишей лінії СВА на радіозахисну і регенеративну активність останніх

ням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

ККМ отримували зі стегового кісткового мозку дорослих мишей, а КФП – із печінки 14-добових ембріонів мишей механічним способом і накопичували їх кріоконсервуванням за відомою програмою [7]. До використання заморожені клітини зберігали у рідкому азоті. Слід відмітити, що гемопоєз у фетальній печінці починається на 6-ту добу гестації, сягає піку на 13-14-ту добу і закінчується приблизно на 16-ту добу [7]. Зазначений термін гестації був обраний тому, що саме у цей період вміст ГСК і прогеніторів у печінці достатньо великий.

Культуру клітин МСК тимуса отримували, розміщуючи шматочки органа у живильному середовищі DMEM/F12 з 10 % ембріональної телячої сироватки на поверхні лунок 6-лункових планшетів. На 10-ту добу культивування, коли утворювалися добре помітні численні фіброblastні колонії, із лунок видаляли середовище і додавали в неї по  $5 \cdot 10^6$  розморожених ККМ або КФП в 2 мл свіжого живильного середовища. Інтактні ККМ і КФП витримували той самий час на чистій поверхні лунок для відокремлення можливого ефекту простого механічного контакту від дії мембранного міжклітинного контакту між МСК і ГСК. Усі культури розміщували в  $\text{CO}_2$ -інкубаторі з 5 %  $\text{CO}_2$  при  $37^\circ\text{C}$ . Через 20 год сумісного культивування обережно механічним способом збирали адгезуючі до МСК ГСК і прогенітори, центрифугували (250 g) 10 хв, осад ресуспендували в живильному середовищі і доводили концентрацію клітин до  $2,5 \cdot 10^6$ /мл.

Отримані клітини (по  $0,5 \cdot 10^6$  нормальних та індукованих інкубацією з МСК тимуса ККМ і КФП) в об'ємі 0,2 мл вводили в ретроорбітальної синус летально опроміненим напередодні (за 24 год) мишам лінії

СВА. У кожній дослідній групі було по 30 мишей. За тваринами спостерігали протягом 30 діб, фіксуючи дату загибелі кожної миші. На 25-ту добу імунізували всіх тварин внутрішньоочеревинним введенням  $10^8$  еритроцитів барана. Через 4 доби проводили повторну імунізацію (для розвитку реакції гіперчутливості сповільненого типу - ГСТ) введенням такої самої кількості еритроцитів у подушечку задньої лапи. Ще через добу (30-та доба після опромінення) оцінювали виживаність тварин і визначали показники імунної системи.

Мишей було розділено на такі групи по 30 тварин у кожній: 1 – інтактні миші; 2 – летально опромінені миші, що отримували культуральне середовище (КС); 3 - летально опромінені миші, що отримували ККМ; у 4-й групі тварини отримували ККМ, індуковані МСК тимуса; у 5-й групі миші отримували КФП; і в 6-й – КФП, індуковані МСК тимуса.

У тварин, що вижили на 30-ту добу, визначали абсолютну і відносну масу тимуса і селезінки, кількість тимоцитів, спленоцитів і ККМ, кількість фіброblastних колонієутворюючих одиниць (КУО-Ф) у кістковому мозку [8], кількість лейкоцитів у периферичній крові і клітинний склад лейкоцитарної формули в мазках крові загальноприйнятими в гематології методами [9], поглинальну і бактерицидну активність перитонеальних макрофагів (НСТ-тест), природну цитотоксичність спленоцитів і реакцію бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) брижових лімфовузлів МТТ-методом [10], із запобігання цитостатичної дії вірусу везикулярного стоматиту в культурі продукцію  $\alpha/\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів, індуковану відповідно вірусом хвороби Ньюкасла (ВХН) і конканаваліном А (КонА) [11], і також фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНПа) [12] у супернатантах культур спленоцитів. Визначали реакцію ГСТ [13], кількість антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці методом локального гемолізу в гелі і гемаглютининів та гемолізинів у сироватці крові.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програми Excell (MS Office XP). Для кількісних ознак розраховували середнє значення (M) та помилку середнього ( $\pm m$ ). Використовували непараметричний критерій Мана–Уїтні. При інтерпретації результатів вірогідними вважали значення при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вживаність мишей до 30-ї доби після введення клітинних препаратів представлено на рис. 2. Як можна побачити, інтактні ККМ проявляли лише тенденцію, хоча і чітку, до підвищення виживаності мишей, так само, як і ККМ, інкубовані з МСК тимуса. Значно підвищена радіозахисна дія виявлялася при введенні інтактних КФП, і ще більше вона спостерігається в результаті ін'єкції КФП, інкубованих з МСК тимуса. Але треба зазначити, що між останніми двома групами різниця була не суттєва. Таким чином,

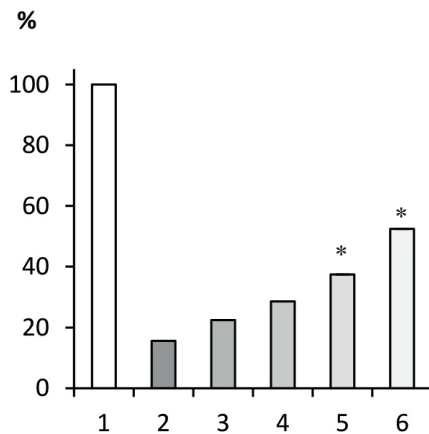


Рис.2. Вживаність (30 діб) летально опроміненних мишей, що отримували різні препарати гемопоетичних стовбурових клітин. 1 – інтактні тварини, 2-6 – опромінені тварини, що отримували: 2 – культуральне середовище, 3 – клітини кісткового мозку інтактні, 4 - клітини кісткового мозку, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса, 5 – клітини фетальної печінки інтактні, 6 - клітини фетальної печінки, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса. \* $P < 0,05$  порівняно з групою опроміненних мишей, що отримували кондиційне середовище

трансплантація ГСК і прогеніторів уже на ранніх термінах підвищувала виживаність опроміненних тварин.

У опроміненних мишей, що отримували КС, суттєво знижувалася маса тіла ( $18,4 \pm 1,8$  щодо  $24,5 \pm 1,4$  г у нормі;  $P < 0,001$ ) Введення клітинних препаратів практично не змінювало цей показник. Але ін'єкція інкубованих з МСК тимуса КФП у той самий час практично нормалізувала масу тіла ( $22,0 \pm 2,0$  г;  $P < 0,001$ ), що, мабуть, свідчить про ефективну нейтралізацію інтоксикаційних впливів на організм у цілому саме індукованими КФП, при введенні яких і виживаність була значно вищою від такої у опроміненних мишей, що не отримували ГСК.

У результаті опромінення зменшувалися абсолютна і відносна маса, кількість тимоцитів в органі і клітинність тимуса (рис. 3, а-г). Введення як інтактних, так і індукованих ККМ, а також індукованих КФП призводило до значного, майже повного, відновлення тимуса. Трансплантація інтактних КФП практично не впливала на зазначені показники. Маса селезінки у опроміненних мишей на 30-ту добу була суттєво зменшеною (див. рис. 3, д, е). Після клітинної трансплантації, особливо індукованих МСК тимуса клітин, вона практично зрівнялася зі значеннями у здорових тварин. Клітинність дещо варіювала, але тільки в групах, де миші одержували індуковані ККМ, спостерігалось виражене збільшення клітинності селезінки порівнянно з тваринами, які одержували нормальні ККМ. Клітинність кісткового мозку у опроміненних мишей значно зменшувалася, а трансплантація всіх клітинних препаратів ГСК і прогеніторів призводила до її відновлення (див. рис. 3, є). Зменшувалася також і кількість КУО-Ф на стегнову кістку у опроміненних мишей, а у тварин, що отримували різні препарати ГСК і прогеніторів, їх число суттєво підвищувалося так, що вже статистично не відрізнялося від показника у інтактних мишей (див. рис. 3, ж).

У опроміненних мишей суттєво зменшу-

валася кількість лейкоцитів (див. рис. 4, а) і абсолютна кількість нейтрофілів у периферичній крові (рис. 4, б), але особливо абсолютне число лімфоцитів (див. рис. 4, в). Абсолютне число моноцитів і еозинофілів теж ітотно знижувалося (див. рис. 4, г, д).

Вміст лейкоцитів у опроміненних мишей зростав лише після введення індукованих КФП. У резі введення індукованих ККМ воно навіть знижувалося. А от кількість лімфоцитів вибірково і значно збільшувалася у мишей, що отримували індуковані ГСК і

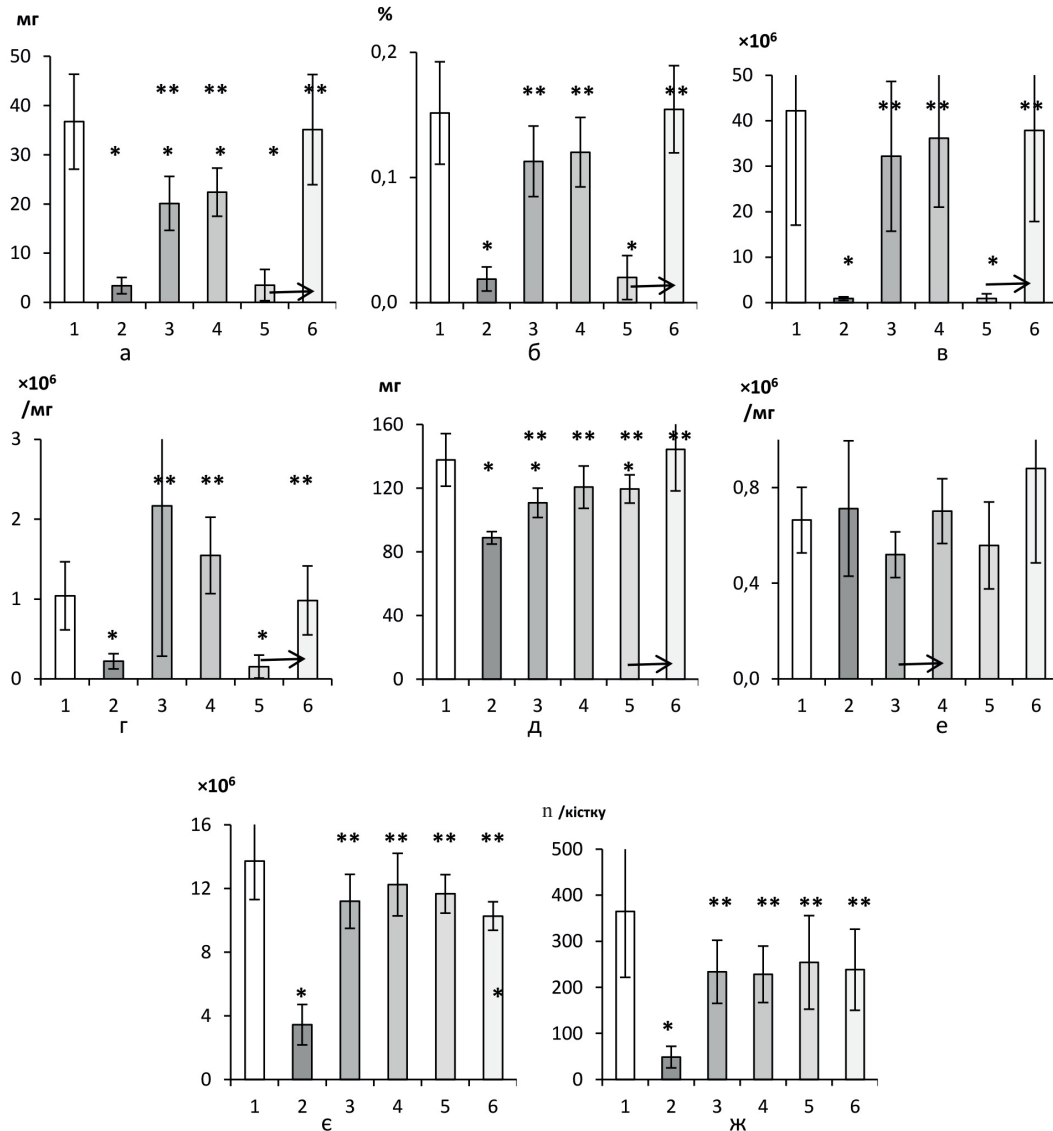


Рис.3. Абсолютна (а) і відносна маса тимуса (б), кількість тимоцитів (в), клітинність тимуса (г), маса (д) і клітинність селезінки (е), кількість клітин кісткового мозку (є) і кількість фіброblastних колонієутворюючих одиниць в кістковому мозку (ж) у опроміненних мишей, що отримували різні препарати гемопоетичних стовбурових клітин. 1 – інтактні тварини, 2-6 – опромінені тварини, що отримували: 2 – культуральне середовище (КС), 3 – клітини кісткового мозку інтактні, 4 - клітини кісткового мозку, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса, 5 – клітини фетальної печінки інтактні, 6 - клітини фетальної печінки, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса. \* $P < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; \*\* $P < 0,05$  порівняно з групою опроміненних мишей, що отримували КС;  $\rightarrow P < 0,05$  порівняння між групами

прогенітори різного походження.

Важливі результати отримані при вивченні природного і адаптивного імунітету. Поглинальна активність макрофагів мишей під впливом опромінювання мала тенденцію до підвищення, але тільки після трансплантації інтактних КФП показник набував достовірності ( $38,8 \pm 5,4$  щодо  $24,1 \pm 5,8\%$  в нормі;  $P < 0,05$ ). У них збільшувалася бактерицидна активність, мабуть, з тієї самої причини, що і поглинальна активність. В усіх групах мишей, що отримували різні клітинні препарати, середні значення також мали чітку тенденцію до збільшення (рис. 5, а), а у тварин, які одержували індуковані ККМ і інтактні КФП вони були суттєво меншими, ніж у опромінених. Після трансплантації

індукованих КФП бактерицидність перевищувала рівень інтактних тварин, хоча тенденція до її зниження порівнянно з опроміненими мишами зберігалася.

Природна цитотоксичність спленоцитів опромінених мишей значно знижувалася, що відповідає високій чутливості до опромінення природних кілерів, а трансплантація всіх досліджених клітинних препаратів призводила до суттєвого її збільшення. Слід також зазначити, що ККМ і КФП, які були інкубовані з МСК тимуса, викликали більш істотну дію (див. рис. 5, б).

Індекс РБТЛ, яка здійснюється клітинами лімфатичних вузлів опромінених мишей, зменшувався в усіх досліджених групах. Реакція суттєво підсилювалася в резуль-

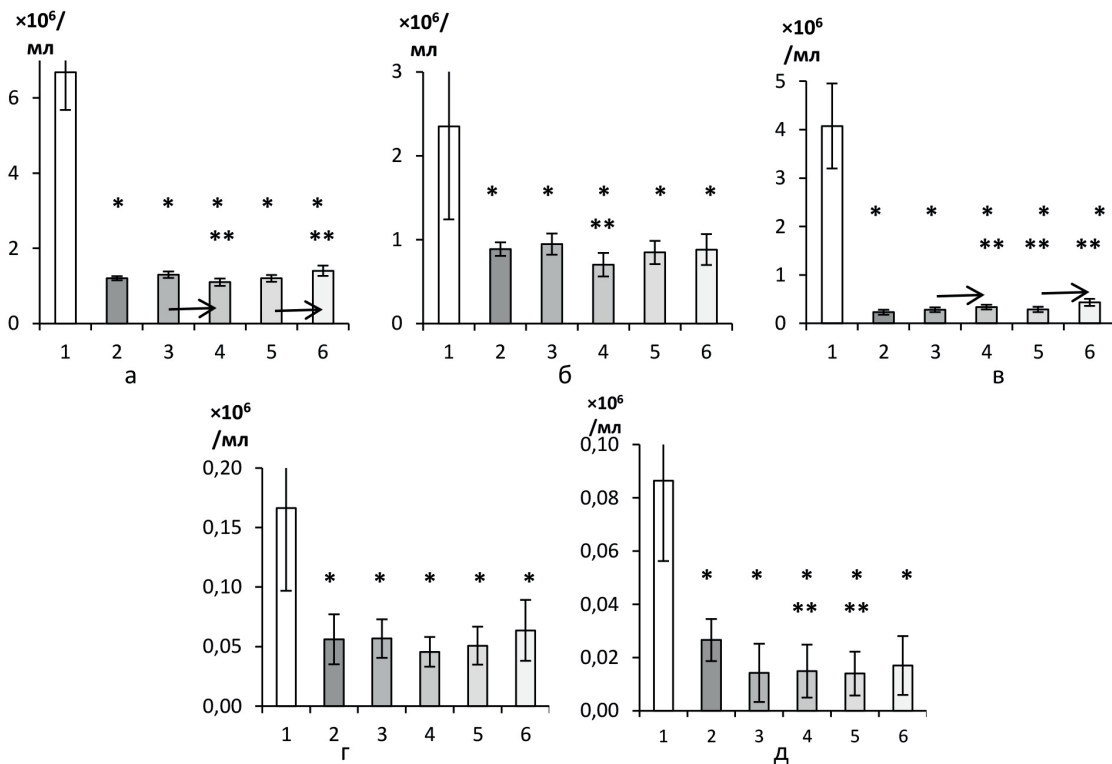


Рис.4. Кількість лейкоцитів (а), нейтрофілів (б), лімфоцитів (в), моноцитів (г) і еозинофілів (д) в периферичній крові опромінених мишей, що отримували різні препарати гемопоетичних стовбурових клітин. 1 – інтактні тварини, 2-6 – опромінені тварини, що отримували: 2 – культуральне середовище (КС), 3 – клітини кісткового мозку інтактні, 4 – клітини кісткового мозку, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса, 5 – клітини фетальної печінки інтактні, 6 – клітини фетальної печінки, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса \*  $P < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; \*\*  $P < 0,05$  порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; →  $P < 0,05$  порівняння між групами



таті трансплантації індукованих ККМ, інтактних і індукованих КФП. Статистично достовірна різниця спостерігалася також між групами мишей, що отримували нормальні та індуковані ККМ на користь останніх (див.

рис. 5, в).

Спленоцити летально опромінених мишей продукували *in vitro* значно меншу кількість ВХН-індукованого  $\alpha/\beta$ - і КонА-індукованого  $\gamma$ -інтерферонів (див. рис.

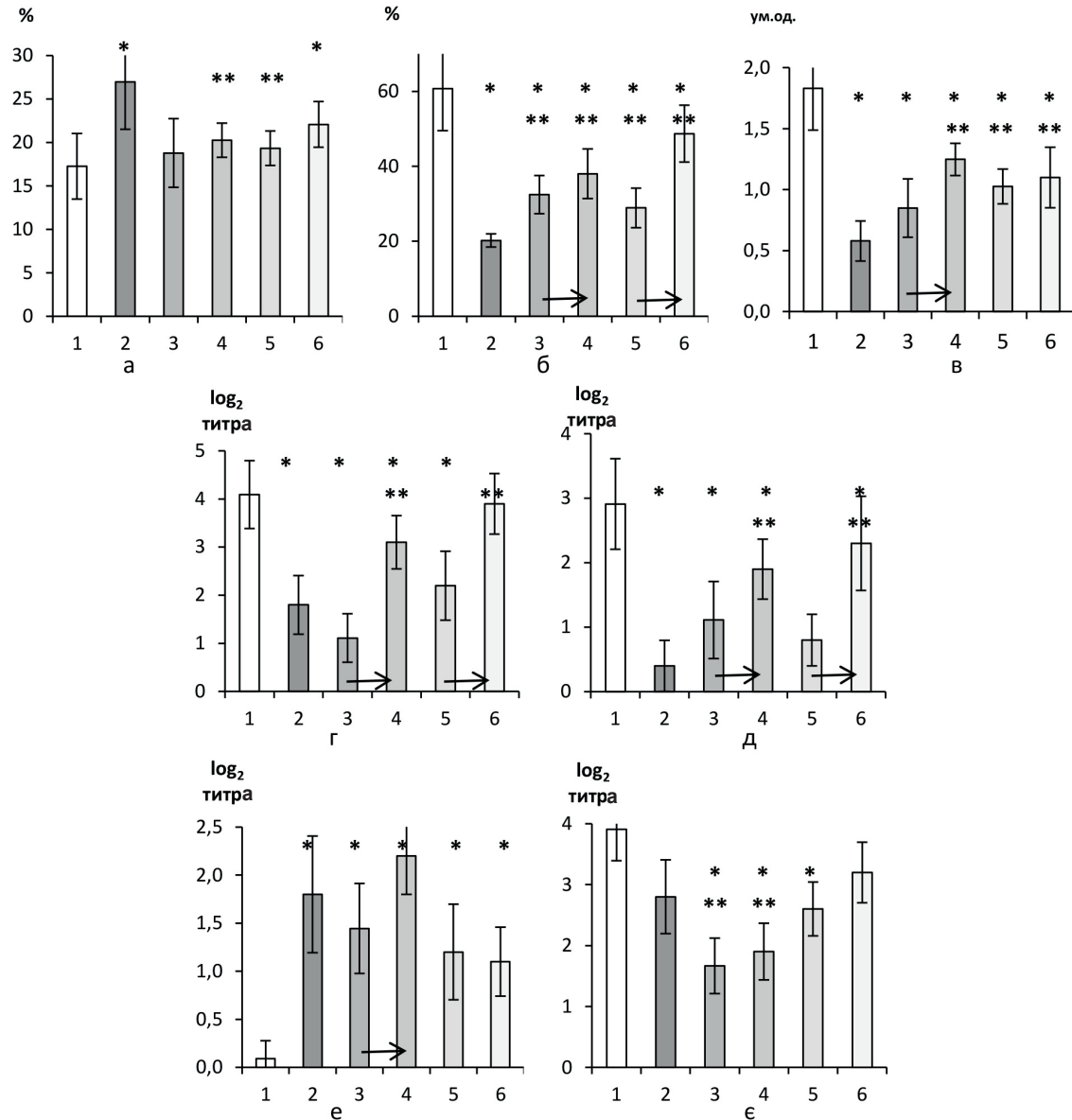


Рис.5. Бактерицидна активність перитонеальних макрофагів (а), цитотоксична активність спленоцитів (б), реакція бласттрансформації клітин лімфатичних вузлів (в), кількість  $\alpha/\beta$  (г) та  $\gamma$  (д) інтерферону, кількість спонтанного (е) та індукованого ЛПС (є) ФНПа в культурі спленоцитів опромінених мишей, що отримували різні препарати гемопоетичні стовбурові клітини. 1 – інтактні тварини, 2-6 – опромінені тварини, що отримували: 2 – культуральне середовище, 3 – клітини кісткового мозку інтактні, 4 - клітини кісткового мозку, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса, 5 – клітини фетальної печінки інтактні, 6 - клітини фетальної печінки, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса. \* P<0,05 порівняно з групою нормальних мишей; \*\* P<0,05 порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; → P<0,05 порівняння між групами

5, г, д). Суттєве зниження продукції вказаних типів інтерферонів спостерігалося і в культурах спленоцитів тварин, які одержували інтактні ККМ і КФП. Введення мишам обох препаратів ГСК і прогеніторів, індукованих МСК тимуса, призводило до значного відновлення здатності спленоцитів до синтезу  $\alpha/\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів.

ФНП $\alpha$  в культурі спленоцитів інтактних мишей визначався у слідових кількостях (див. рис. 5, е), і навпаки, у значній кількості продукувався клітинами опромінених тварин, причому приблизно на однаковому рівні незалежно від властивостей введених ГСК і прогеніторів, за виключенням ККМ, індукованих МСК. Під впливом цих клітин синтезувалося більше ФНП $\alpha$ , ніж при введенні інтактних ККМ і індукованих КФП.

Індукований *in vitro* ліпополісахаридом синтез ФНП $\alpha$  спленоцитами опромінених мишей був менш активним, ніж у інтактних, хоча статистично достовірного зниження порівнянно з групою тварин, які отримували КС, не було (див. рис. 5, є). У тварин, що отримували не індуковані КФП, вміст ФНП $\alpha$  наближався до рівня опромінених мишей. У опромінених мишей, що отримували КФП, індуковані МСК тимуса, синтез ФНП $\alpha$  на введення ліпополісахариду був майже таким, як у інтактних тварин, що свідчить, мабуть, про потенціювання синтезу ФНП $\alpha$  дією індукованих МСК КФП. Вміст ФНП $\alpha$  у опромінених мишей, що отримували обидва препарати ККМ, був істотно зниженим.

Інтенсивність реакції ГСТ у опромінених мишей і значно знижувалася (рис. 6). У тварин, що отримували інтактні ККМ, КФП, і індуковані КФП. Тільки під впливом індукованих ККМ цей показник істотно підвищувався (рис. 6). Вивчення гуморального імунітету показало, що у опромінених мишей формування антитілоутворюючих клітин (АУК) у відповідь на імунізацію еритроцитами барана було значно пригнічено, що відповідає високій чутливості В-лімфоцитів до опромінення. (див. рис. 6, б,

в). Їх кількість істотно збільшувалася тільки в групах мишей, що отримували індуковані ГСК і прогенітори, як кісткового мозку, так і фетальної печінки. Інтактні клітини, виділені з цих органів, проявляли тенденцію до стимулюючої дії, але статистично не достовірної. Аналогічна динаміка по групах спостерігалася і при визначенні гемолізинів і гемаглютининів у сироватці крові (див. рис. 6, г, д). Результати свідчать, з одного боку, про високу чутливість гуморальної імунної відповіді до опромінення, а з іншого, про значну стимулюючу роль у процесі її формування ГСК і прогеніторів, інкубованих з МСК тимуса.

Таким чином, в результаті летального опромінення в дозі 9 Гр у мишей розвивався типовий кісткомозковий синдром, що досить швидко призводив до загибелі тварин. На 30-ту добу виживаність становила 20 %. Спостерігалося спустошення кісткового мозку, тимуса і, меншою мірою, селезінки внаслідок чутливості до опромінення швидко проліферуючих клітин і інтерфазної загибелі за механізмами апоптозу лімфоцитів, які знаходяться у стані спокою. Гранулоцити менш чутливі до опромінення, але в крові виявлялася виражена гранулоцитопенія, причиною чого є висока радіочутливість кісткомозкових мієлоїдних клітин.

Підвищення поглинальної і бактерицидної активності у опромінених мишей вважається наслідком їх реакції на клітинний дебрис, що утворюється в результаті загибелі великої кількості клітин. З цієї самої причини у них значно зростає кількість так званого спонтанного інтерферону і ФНП $\alpha$ . Відомо, що підвищується і кількість інших прозапальних цитокінів: інтерлейкіну-1 та інтерлейкіну-6, що продукуються стромальними клітинами [14]. Така ситуація може розглядатися як компенсаторна реакція з урахуванням відомої радіопротекторної дії ФНП $\alpha$  [15,16]. Стимулююче подразнення синтезуючих ФНП $\alpha$  клітин настільки виражено, що додаткова індукція ЛПС натрапляє на певний і



відомий період рефрактерності.

Постраждала природна цитотоксичність і проліферативна активність Т-лімфоцитів, що відображає високу чутливість до опромінення їх і НК-клітин. До того ж у цих клітин виявилось значне пригнічення синтезу  $\alpha/\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів, що також знижує захищеність тварин від факторів кістковомозкового синдрому. Відомо, що інтерферони можуть забезпечувати лімфоцитарно-стромальну контактну взаємодію з експресією ІЛ-7 [17]. Виявилось, що інтерферон  $\alpha$  стимулює проліферацію і диференціювання ГСК [18]. При нокауті репресорного регуляторного фактора 2 (IRF-2) у мишей суттєво зростала популяція кістковомозкових ГСК з фенотипом LKS (Lin<sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>). Інтерферон  $\gamma$

більшу активність проявляє відносно МСК, впливаючи на фенотип клітин [19], а також пригнічуючи продукцію інтерлейкіну-10, сприяючи встановленню міжклітинних контактів [20]. Висока чутливість до опромінення Т-лімфоцитів зумовлює і значне гальмування реакції ГСТ. Найбільш виражене пригнічення функції антитілоутворення відображає наявність дуже високої радіочутливості у В-лімфоцитів.

Трансплантація ГСК і прогеніторів у клітинних препаратах і ККМ, і КФП здебільшого позитивно позначалася на показниках імунної системи, а попередня інкубація з МСК тимуса ККМ призводила до більш суттєвої у напрямку зміни імунологічних показників: збільшення маси і клітинності

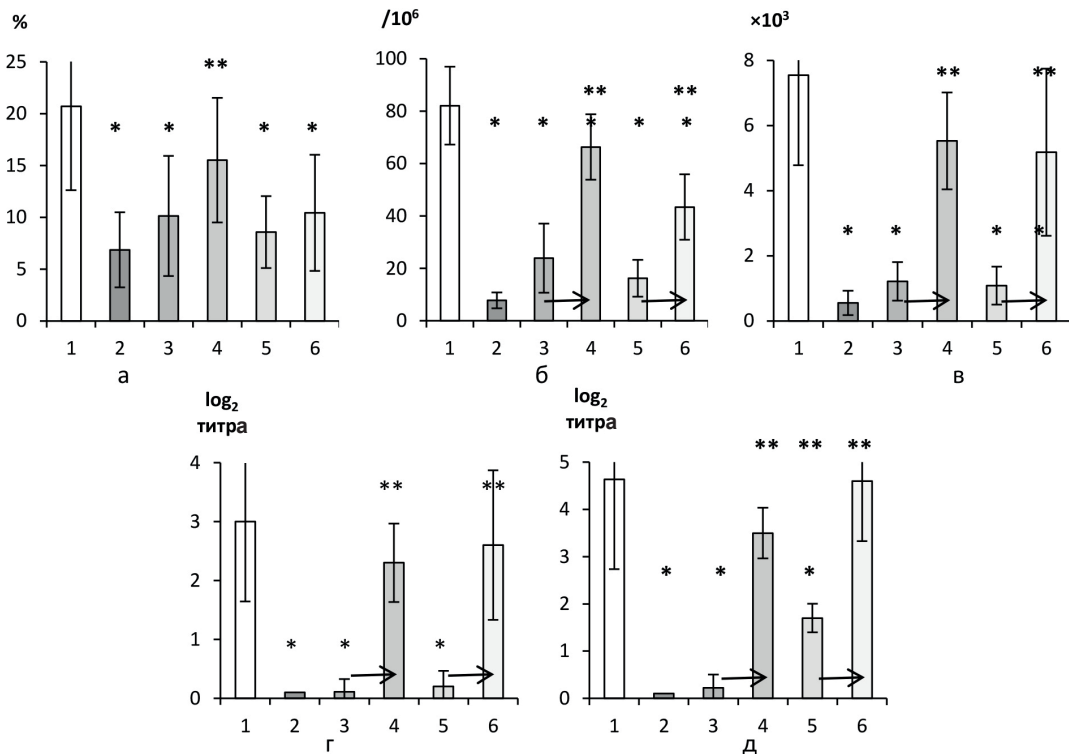


Рис.6. Індекс гіперчутливості сповільненого типу (а), кількість антитілоутворюючих клітин на  $10^6$  спленоцитів (б), кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці (в), вміст гемаглютининів (г) та гемолізінів (д) у сироватці крові опромінених мишей, що отримували різні препарати гемопоетичних стовбурових клітин. 1 – інтактні тварини, 2-6 – опромінені тварини, що отримували: 2 – культуральне середовище (КС), 3 – клітини кісткового мозку інтактні, 4 - клітини кісткового мозку, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса, 5 – клітини фетальної печінки інтактні, 6 - клітини фетальної печінки, індуковані мультипотентними стромальними клітинами тимуса \*  $P < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; \*\*  $P < 0,05$  порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; →  $P < 0,05$  порівняння між групами

селезінки і числа лімфоцитів у периферичній крові, стимуляції природної цитотоксичності, РБТЛ, синтезу  $\alpha/\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів, підвищення вмісту спонтанного ФНП $\alpha$  і активації антитілоутворення. Індуковані МСК тимуса КФП за деякими параметрами проявляли більшу активність, ніж індуковані ККМ: підвищення маси і клітинності тимуса, кількості лімфоцитів у периферичній крові, стимуляції природної цитотоксичності, синтезу  $\alpha/\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів, активації антитілоутворення. Але в цілому підвищена контактом з МСК дія ККМ і КФП була значною мірою схожою, що свідчило про ефективну стимуляцію у дослідженій системі ГСК і прогениторів різного ступеня зрілості.

## ВИСНОВКИ

Через 30 днів після летального опромінення мишей лінії СВА спостерігалися виражені негативні структурно-функціональні зміни в імунній системі з боку природного і адаптивного імунітету. Розвивався кісткомозковий синдром зі значним зменшенням клітинності тимуса, загальної клітинності кісткового мозку і кількості стромальних клітин, що здатні до утворення фібробластних колоній, числа лейкоцитів у периферичній крові, особливо лімфоцитів, нейтрофілів, моноцитів і еозинофілів. Природний імунітет опромінених мишей характеризувався підвищенням поглинальної і бактерицидної активності перитонеальних макрофагів і різким зниженням природної цитотоксичності, значним зниженням продукції спленоцитами  $\alpha/\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів, індукованих *in vitro* ВХН і КонА, а також підвищенням продукції ними спонтанного ФНП $\alpha$  при несуттєвому зростанні синтезу цього цитокіну, індукованого ЛПС. Зміни адаптивного імунітету проявлялися значним зниженням проліферативної активності Т-лімфоцитів у відповідь на фітогемаглютинін, пригніченням реакції ГСТ, формуванням АУК і антитілоутворення.

Вплив трансплантації ГСК і прогениторів ККМ виявляв тенденцію до збільшення 30-добової виживаності мишей, а введення КФП і КФП, індукованих МСК тимуса, підвищувало її суттєво. В результаті індукції ГСК і прогениторів інкубацією з МСК тимуса майже в усіх дослідах, більшою частиною однонаправлено і суттєво, зростала регенеративна і імунобіологічна активність трансплантованих ККМ і КФП, що свідчило про ефективність стимулювання ГСК і прогениторів різного ступеня зрілості контактною взаємодією з МСК тимуса, які за цих умов отримували, і підвищену радіозахисну активність.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Е.И. Никольская, Г.М. Бутенко**

## **КОРРЕКЦИЯ КОСТНОМОЗГОВОГО СИНДРОМА У ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и прогениторов, представленных в препаратах клеток костного мозга (ККМ) и фетальной печени (КФП), положительно сказывалось на показателях иммунной системы летально облученных мышей, тормозя развитие костномозгового синдрома: существенно увеличивалась масса и клеточность тимуса и костного мозга, а также возрастала способность стромальных клеток костного мозга к образованию фибробластных колоний. Значительно повышалась естественная цитотоксическая и пролиферативная активность лимфоцитов. Предварительная инкубация с мультипотентными стромальными клетками (МСК) тимуса ККМ приводила к существенному росту иммунологических показателей: увеличение на 35 % клеточности селезенки и на 20 % числа лимфоцитов в периферической крови, стимуляции на 17 % естественной цитотоксичности, на 47 % пролиферативной активности Т-лимфоцитов, в 2,8 раза синтеза  $\alpha/\beta$ - и в 1,7 раза  $\gamma$ -интерферонов, повышение на 50 % содержания спонтанного фактора некроза опухолей  $\alpha$  и активации

антителообразования в 2,8 раза. Индуцированные МСК тимуса КФП по некоторым параметрам проявляли гораздо большую активность: повышение в 10,3 раза массы и в 6,8 раза клеточности тимуса, на 52 % количества лимфоцитов, стимуляции на 69 % естественной цитотоксичности, в 1,8 раза синтеза  $\alpha/\beta$ - и в 2,9 раза  $\gamma$ -интерферонов, активации антителообразования в 2,7 раза. Действие ККМ и КФП иногда различалась в количественном отношении, но всегда была однонаправленным. Результаты могут быть использованы для разработки методов повышения регенеративной и радиозащитной активности трансплантатов ГСК.

Ключевые слова: радиационный иммунодефицит; патогенез; регенерация; гемопоэтические стволовые клетки; мультипотентные стромальные клетки; межклеточное взаимодействие; трансплантация.

**K.I. Nikolska, G.M. Butenko**

### **CORRECTION OF BONE MARROW SYNDROME IN IRRADIATED MICE BY TRANSPLANTATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS PRE-INCUBATED WITH THYMIC MULTIPOTENT STROMAL CELLS**

The transplantation of hematopoietic stem (HSC) and progenitors from bone marrow cells (BMC) and fetal liver cells (FLC) was positively noted on the immune system parameters of lethally irradiated mice. The development of bone marrow syndrome was inhibited: the thymic mass and cellularity of thymus and bone marrow increased substantially, the ability of bone marrow stromal cells to form fibroblast colonies increased. The natural cytotoxic and proliferative activity of lymphocytes significantly increased. Pre-incubation of BMC with thymic multipotent stromal cells (MSC) resulted in a significant increase in immunological parameters. There was observed a 35 % increase of in the spleen cell count, a 20 % increase in the number of lymphocytes in peripheral blood, stimulation by 17 % of natural cytotoxicity, 47 % proliferative activity of T lymphocytes, 2.8 times synthesis of  $\alpha/\beta$ - and 1.7-fold  $\gamma$ -interferons, a 50 % increase in the amount of spontaneous FNP $\alpha$  and activation of antibody formation in 2.8 times. FLCs induced by thymic MSCs showed significant activity in some parameters. There was an increase of 10.3 times in mass and 6.8 times in thymic cell count, 52 % in lymphocytes in peripheral blood, stimulation by 69 % of natural cytotoxicity, 1.8 times synthesis of  $\alpha/\beta$ - and 2.9 times in  $\gamma$ -interferons, activation of antibody formation in 2.7 times. The effect of BMC and FLC sometimes differed quantitatively, but was always unidirectional. The results can be used to develop the methods for increasing the regenerative and radioprotective activity of HSC transplants.

Key words: radiation immunodeficiency; regeneration; hematopoietic stem cells; multipotent stromal cells; intercellular interaction; transplantation.

*State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

### **REFERENCES**

1. Chumak AA, Bazyka DA, Tal'ko VV, Minchenko Zh.N. The immune status of persons with acute radiation sickness and children evacuated from the 30-kilometer zone of the Chernobyl nuclear power plant. *Probl Rad Medi and Radiobiol.* 1992; 4:63-6 [Russian].
2. Lisianyї MI. Mesenchymal stem cells and their immunological properties. *Fiziol Zh.* 2013;59(3):126-34 [Ukrainian].
3. Nikolskaya EI, Butenko GM. Structural-functional organization of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Cell and Organ Transplantation.* 2016; 4(1):82-100.
4. Nikolsky IS, Nikolskaya VV, Demchenko DL, Taranukha LI, Semenova YA, Serebrovska TV. Effects of multipotent stromal cell transplantation on mice immune system under conditions of its regeneration. *Fiziol Zh.* 2018;64(4):3-11. [Ukrainian].
5. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJ. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med.* 2000;191:1051-6.
6. Chumak AA, Abramenko IV, Vojchenko PK, Pleskach OYa. Persistent viral infections as an important factor in the pathogenesis of the remote consequences of the Chernobyl disaster. *Medical consequences of the accident at the Chernobyl nuclear power plant* (Eds O.F. Vozianov, V.G. Bebeshko, D.A. Bazy'ka). Kiev: DIA. 2007;437-45 [Ukrainian].
7. Grishchenko VI, Lobynceva GS, Votyakova IA, Shershkov SI. Hematopoietic cells of the embryonic liver. Kiev: Naukova dumka. 1988; 192 [Russian].
8. Freshni RY. *Animal Culture: A Practical Guide.* Moscow: Binom. Laboratoriya znanij. 2010;691 [Russian].
9. Men'shikov VV. *Guidelines for clinical laboratory diagnostics.* Moscow: Medicina. 1982. [Russian].
10. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16; 65(1-2):55-63.
11. Stewart WE. *Interferon systems.* Vienna/New York: Springer. 1979.
12. Huang M, Yao PW, Chang MD, Ng SK, Yu CH, Zhang YF, et al. Identification of anti-inflammatory fractions of *Geranium wilfordii* using tumor necrosis factor- $\alpha$  as a drug target on Herbochip® - an array-based high throughput screening platform. *BMC Complement Altern Med.* 2015 May 12;15:146. doi: 10.1186/s12906-015-0665-9.
13. Frimmel G. *Immunological methods* edited by Frimmel G. Moscow: The world. 1987. [Russian].
14. Hallahan DE, Spriggs DR, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR. Increased tumor necrosis factor  $\alpha$  mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 Dec;86(24):10104-7.
15. Neta R, Douches S, Oppenheim JJ. Interleukin 1 is a radioprotector. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2483-5.
16. Neta R, Oppenheim JJ. Cytokines in therapy of radiation

- injury. *Blood*. 1988 Sep;72(3):1093-5.
17. Sekai M, Tani-ichi S, Yoneyama M, Fujita T, Kina T, Ikuta K. Lymphocyte-stromal cell interaction induces IL-7 expression by interferon regulatory factors. *Mol Immunol*. 2013 Jul;54(3-4):378-85. doi: 10.1016/j.molimm.2013.01.002. Epub 2013 Jan 30.
18. King KY, Matatall KA, Shen CC, Goodell MA, Swierczek SI, Prchal JT. Comparative long-term effects of interferon  $\alpha$  and hydroxyurea on human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2015 Oct;43(10):912-8.e2. doi: 10.1016/j.exphem.2015.05.013.
19. Petinati NA, Kapranov NM, Bigil'deev AE, Popova MD, Davydova YO, Gal'tseva IV, et al. Changing the Properties of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells by IFN $\gamma$  Admini. *Bull Experim Biol and Med*. 2017;163 (2):230-4.
20. Hermankova B, Zajicova A, Javorkova E, Chudickova M, Trosan P, Hajkova M, et al. Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN- $\gamma$ -treated mesenchymal stem cells. *Immunobiology*. 2016 Feb;221(2):129-36. doi: 10.1016/j.imbio.2015.09.017. Epub 2015 Sep 12.

Матеріал надійшов до редакції 01.10.2018