

УДК: 617. – 089.843

Я.-М. Семенова, мол. наук. співроб.,
І. Нікольський, д-р мед. наук, проф.
ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України", Київ, Україна,
Л. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПРИГНІЧЕННЯ ФОРМУВАННЯ ШЛУНКОВИХ ВИРАЗОК ПРИ ІМОБІЛІЗАЦІЙНОМУ ВОДОІМЕРСІЙНОМУ СТРЕСІ ПОПЕРЕДНЬОЮ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН

Розглянуто вплив попередньої трансплантації мультипотентних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку на шлункове виразкоутворення і стан імунної системи в умовах гострого та пролонгованого стресів. У щурів лінії Вістар було відтворено імобілізаційний водоімерсійний стрес 2 типів: гострий та пролонгований. Досліджено кількість і площу стресових виразок, показники тимусу і селезінки, а також гематологічні показники, проліферативну і цитотоксичну активність мононуклеарів периферичної крові, спленоцитів і клітин лімфатичних вузлів, визначено поглинання клітин нормалізувалась, за виключенням лімфоцитів. Природна цитотоксичність і проліферативна активність спленоцитів, клітин лімфатичних вузлів і периферичної крові при гострому та пролонгованому стресах у результаті введення МСК суттєво не змінювалась. У результаті введення МСК кісткового мозку за 24 год до останнього відтворення стресових реакцій у моделі пролонгованого стресу значно зменшувалась кількість та площа виразок, що в цілому свідчить про антивиразкову дію клітин, і нормалізувались викликані стресом кількісні клітинні зміни в імунній системі. Трансплантація МСК кісткового мозку щурів перед відтворенням у них стресу підсилює адаптаційні антистресові механізми, які розвиваються при пролонгованому стресі, що призводить до пригнічення шлункового виразкоутворення і суттєво змінює показники активності імунної системи. Можна припустити, що одним із механізмів дії на організм МСК є сприяння формування адаптаційних реакцій.

Ключові слова: водоімерсійний холодний стрес, імунна система, мультипотентні стромальні клітини, трансплантація.

Вступ. Виразкова хвороба є однією із найбільш розповсюджених і важких. Окремі її види мають різну етіологію і патогенез, що обґрунтовує селективний підхід до терапії. У цьому аспекті треба мати на увазі, що з часів виходу у світ робіт Г. Сельє формування виразок у шлунку вважається одним із класичних проявів розгортання стресових реакцій. Серед останніх важливе значення має не тільки сила діючого фактору, а і частота, кратність і тривалість впливу іноді з пролонгацією реакції і формуванням хронічного стресового процесу. Але роль у виразкоутворенні гострого або пролонгованого (що часто визначається як хронічний) стресів ще не зовсім зрозуміла. З іншого боку, стресові фактори починаються не лише на стані слизової оболонки шлунку, а часто є супутнім фактором формування багатьох видів патологій, у тому числі імунопатологій [1]. Тому, вивчення особливостей стресу по імунологічним параметрам одночасно з дослідженням виразкоутворення може поглибити уявлення про механізми переходу фізіологічної стресової реакції в процес виникнення патологічних змін у слизовій оболонці шлунку.

Останнім часом з метою корекції різних видів патологій використовують мультипотентні стромальні клітини (МСК), які володіють регенеративними і імунобіологічними властивостями, мають високу проліферативну активність [9, 17]. Особливе місце займає клітинна терапія, заснована на трансплантації МСК кісткового мозку, властивості яких вивчені краще, ніж МСК іншого тканинного походження. Але вплив цих клітин на розвиток стресу і окремих класичних імунологічних його проявів, що виникають одночасно зі шлунковим виразкоутворенням практично не вивчений.

Метою роботи було дослідження впливу попередньої до відтворення стресу трансплантації МСК кісткового мозку на шлункове виразкоутворення і стан імунної системи в умовах гострого та пролонгованого стресів.

Матеріали та методи. Досліди проведені на самцях щурів лінії Вістар масою 220–260 г з розплідника Інституту патології, онкології та радіобіології

ім. Р.Є. Кавецького НАН України, які перебували в стандартних умовах віварію. Усі маніпуляції та виведення тварин з експерименту проводили з дотриманням 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). Під час проведення експерименту тварини отримували збалансоване харчування та мали вільний доступ до води.

Для трансплантації використовували МСК кісткового мозку щурів лінії Вістар другого пасажу, тому що на ранніх термінах культивування МСК вважаються більш генетично безпечними та стабільними, зберігають ідентичність і мають високу клонування активність [13, 16], а при тривалому культивуванні в клітинах виявляються хромосомні аномалії [18, 23].

МСК отримували із стегнової кістки методом механічної дезагрегації строми кісткового мозку. Агезуючу до пластику фракцію клітин, культивували при 37°C та 5 % атмосфері CO₂ та пересівали до 2 пасажу (поживне середовище DMEM/F12, 10 % ембріональної телячої сироватки, 4 нг/мл основного фактору росту фібробластів, 0,5 мг/мл L-глутаміну, 1 мкг/мл фунгізону, 50 мкг/мл гентаміцину). Враховуючи, що для постановки експерименту потрібна достатня кількість клітин, отримували пул МСК 2-го пасажу, накопичували і зберігали кріоконсервуванням, використовуючи програмний заморожувач "KRYO 560 16" ("Planer", Велика Британія). Клітини заморожували в три етапи: перший етап – від кімнатної температури до (-3,5 ± 0,5)°C зі швидкістю охолодження (1 ± 0,5) град/хв; другий етап – швидкість охолодження (0,4 ± 0,1) град/хв до температури -9°C; третій етап – до температури -80°C зі швидкістю охолодження 10 град/хв. Потім пробірки з клітинами занурювали у рідкий азот. Зразки розморожували безпосередньо перед застосуванням при температурі (40 ± 0,5)°C до появи в кріопробірці рідкої фази. Після повного розморожування клітини відмивали від кріопротектора шляхом

центрифугування при 250 g протягом 5 хв із подальшим ресуспендуванням у живильному середовищі.

Експериментальне виразкоутворення у шлунку піддослідних тварин викликали методом імобілізаційного водоімерсійного стресу. Згідно з даною моделлю, імобілізованих тварин витримували 3 години у воді (23°C), що доходила до рівня мечоподібного відростка. Стрес відтворювали у двох варіантах: гострий та пролонгований стрес. Для отримання гострого стресу реакцію відтворювали одноразово. Для отримання пролонгованого стресу щурів стресували тричі з інтервалом у 24 год у перші три дні, потім через 96 год ще раз відтворювали стрес. Розморожені МСК кісткового мозку (4×10^6 в 0,2 мл середовища DMEM/F12) вводили у хвостову вену за 24 год до гострого стресу або останнього відтворення стресу при моделюванні пролонгованого стресу.

Було сформовано п'ять експериментальних груп тварин: I – контрольні (інтактні) щури (n=14), II – щури, яким відтворювали гострий стрес (n=11), III – щури, яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали гострий стрес (n=8), IV – щури, яким відтворювали пролонгований стрес (n=6), V – щури, яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали пролонгований стрес (n=6).

Експериментальні дослідження здійснювали відразу після припинення дії стресових факторів. Розмір виразок (середній діаметр) в шлунках вимірювали за допомогою бінокулярної лупи з окуляр-мікрометром, визначаючи кількість та сумарну площу виразок в мм^2 згідно з формулою $S = \frac{\pi d^2}{4}$.

Визначали абсолютну і відносну масу тимусу і селезінки, кількість тимоцитів і спленоцитів, клітинність (кількість клітин в 1 мг органу) тимусу і селезінки, а також кількість клітин кісткового мозку. Кількість лейкоцитів, лімфоцитів, гранулоцитів, еритроцитів, тром-

боцитів, концентрацію гемоглобіну в периферичній крові визначали на автоматичному гематологічному аналізаторі PARTICLE COUNTER (модель PCE-210) (ERMA INC, Японія). Вивчення проліферативної активності мононуклеарів периферичної крові, спленоцитів, клітин лімфатичних вузлів і природної цитотоксичності здійснювали МТТ-методом. Визначали також здатність нейтрофілів поглинати інактивовані клітини *Staphylococcus aureus*. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програм Excell (MS Office XP) та Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Для визначення відмінностей між досліджуваними групами використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні (U). Дані представлені у вигляді медіани (Median) з нижнім і верхнім кватилиями (25–75 %). При інтерпретації результатів критичною величиною рівня значущості вважали $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. У контрольних щурів патології слизової оболонки шлунку виявлено не було. Візуальне дослідження слизової оболонки шлунку одразу після стресу виявило умовно дві форми виразкових уражень у дослідних тварин: перша – малі виразки (площею менше $0,5 \text{ мм}^2$), друга – великі виразки (площею більше 4 мм^2) та меншою кількістю малих виразок.

Кількість виразок (рис. 1А) та їх площа (рис. 1Б) при гострому і пролонгованому стресі достовірно не відрізнялися. Кількість виразок у тварин з гострим стресом практично не змінювалась і в результаті введення МСК. Проте у щурів, які отримували МСК при пролонгованому стресі кількість уражень достовірно зменшувалась. Так саме значно зменшувалась при пролонгованому стресі і площа виразок. Таким чином, при пролонгованому стресі зростала чутливість процесу виразкоутворення до дії попередньо трансплантованих МСК, що проявлялось зменшенням кількості виразок і їх площі.

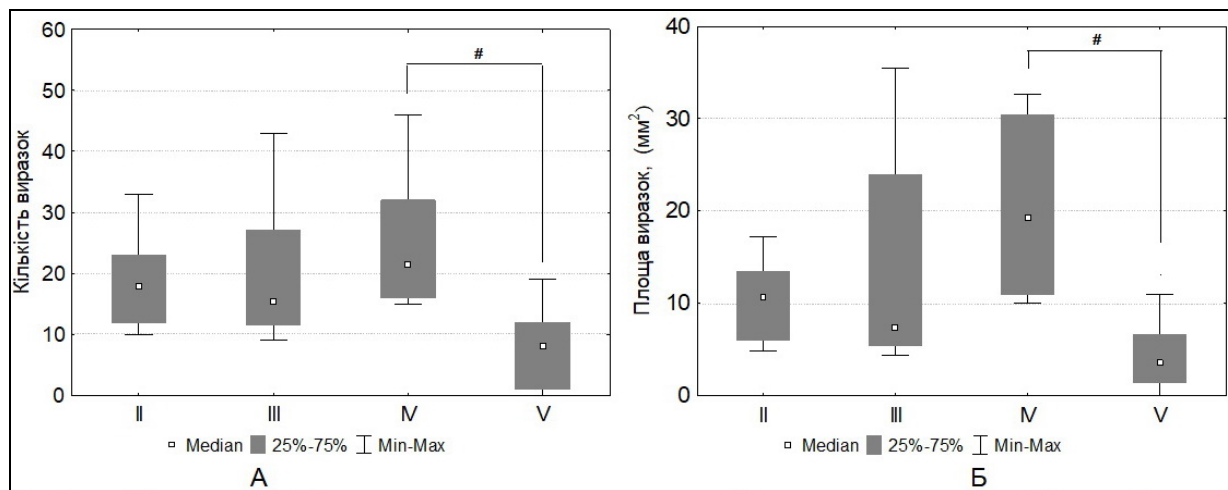


Рис 1. Кількість (А) та площа (Б) виразкових уражень шлунку щурів при експериментальній виразці, отриманій за допомогою імобілізаційної водоімерсійної моделі стресу

Групи: II – щури яким відтворювали гострий стрес, III – щури яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали гострий стрес, IV – щури яким відтворювали пролонгований стрес, V – щури яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали пролонгований стрес. # – $p < 0,05$ між групами.

Відомо, що трансплантовані МСК здатні мігрувати у вогнища запалення і здійснювати регенеративну дію.

Але такий механізм не може здійснюватися в умовах нашого експерименту, оскільки МСК трансплантуються, коли виразки ще відсутні. Можна припустити, що головну роль МСК відіграють, впливаючи на системні механізми. Гіперкатехолемія викликає адренергічну вазоконстрикцію і ішемію артерійол м'язової оболонки шлунку, що веде до виникнення виразко-геморагічних ушкоджень [19]. Помітну роль відіграють холінергічні механізми. На моделі водоімерсійного стресу встановлено,

що кількість стресових виразок суттєво знижується завдяки нейрональним (введення холінолітика метацина за 30 хв до відтворення стресу) і ненеурональним ефектам (введення метацину за 14 діб до початку стресу). Причому, зміни корелювали з активністю імунної системи. При ефективній профілактиці метацином антитілогенез і рівень кортикостерона у сироватці крові наближались до базального рівня. Не ефективна профілактика сприяла підвищенню активності В-лімфоцитів і синтезу глюкокортикоїдів [2]. Між тим, є дані про захисну роль глюкокортикоїдів, які підвищуються у кількості у відповідь на гострий стрес [11]. Гастропротекторну дію має сповільнення процесів перекисного окислення ліпідів і посилення активності антиоксидантної системи організму [6, 7]. Проведений при водоімерсійному стресі протеомний аналіз клітин показав зміни активності 26 білків; 13 із них були значно активовані, включаючи піруваткіназу і кальретікулін, які тісно пов'язані з енергетичним обміном. Активність 12 білків була значно зниженою, в тому числі тих, які важливі для білкового обміну і загибелі клітин [24].

У патогенезі виразкоутворення суттєву роль відіграють запальні захворювання кишківника, у розвитку яких велику роль відіграє імунна система. До теперішнього часу вважалося, що основне значення мають Т-хелпери 2 типу (Th2). Але наразі провідна роль відводиться Th17 і прозапальним цитокинам, які ними сек-

ретуються – IL4, IL17A, IL21, IL22 [4]. МСК2 значно пригнічують ці процеси.

На моделях опромінених тварин достатньо переконливо показано, що трансплантація МСК забезпечує швидке відновлення тонкого кишківника з регенерацією епітелію слизової оболонки і підвищує виживаність мишей. При цьому відбувається стимуляція ендогенної проліферації і пригнічення апоптозу епітелію [10, 15, 21, 22].

Отримані дані також свідчать, що МСК ефективно стимулюють регенерацію імунної системи. На рисунку 2 наведені результати дослідження відносної маси та кількості клітин у тимусі і селезінці. Після гострого стресу у тварин спостерігалася достовірне збільшення відносної маси тимусу (рис. 2А), ймовірно, за рахунок судинного стазу і тканинного набряку [19], що підтверджувалося зменшенням клітинності (рис. 2Б), і що узгоджується з відомою чутливістю тимоцитів до глюкокортикоїдів і здатністю до міграції на периферію при стресі [5, 12]. Попереднє введення МСК при гострому стресі не впливало на клітинність тимусу, але призводило до зменшення маси органу. Зміни цих показників можуть свідчити про ефективний вплив трансплантованих МСК на мікроциркуляцію внаслідок протизапальної дії МСК та регуляції процесів міграції і апоптозу тимоцитів [3]. При пролонгованому стресі спостерігалася значне зниження клітинності тимусу, як і при гострому стресі. Введення МСК нормалізувало ці показники щодо контролю.

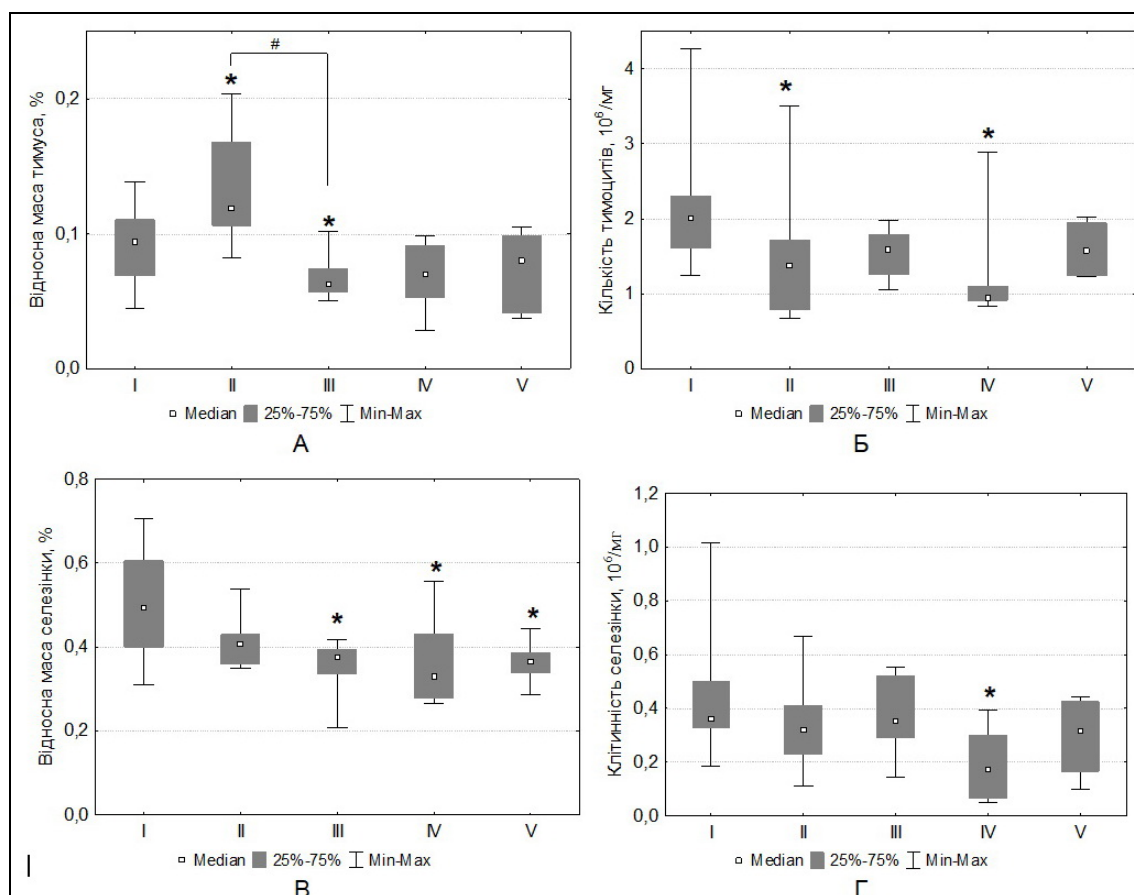


Рис 2. Показники тимусу та селезінки стресованих щурів: А – відносна маса тимусу; Б – клітинність тимусу; В – відносна маса селезінки; Г – клітинність селезінки

Групи: I (контрольна) – нормальні щури, II – щури яким відтворювали гострий стрес, III – щури яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали гострий стрес, IV – щури яким відтворювали пролонгований стрес,

V – щури яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали пролонгований стрес. * – $p < 0,05$ порівняно з групою контрольних тварин; # – $p < 0,05$ між групами.

Відносна маса селезінки (рис. 2В) у стресованих щурів достовірно зменшувалась майже у всіх групах. Введення МСК практично не впливало на ці показники. Після пролонгованого стресу суттєво знижувалась клітинність селезінки (рис. 2Г). А при введенні МСК вона вже достовірно не відрізнялася від контролю. Таким чином, і при гострому, і при пролонгованому стресі МСК нормалізували клітинність і тимусу і селезінки, а при гострому стресі діяли у сторону нормалізації відносної маси тимусу.

У периферичній крові тварин з пролонгованим стресом спостерігався характерний для стресу лейко-

цитоз (рис. 3А) і лімфоцитоз (рис. 3Б), а підвищена кількість великих грануловмісних лімфоцитів (ВГЛ) (рис. 3В) була і після гострого, і після пролонгованого стресу, що свідчить про більшу участь пролонгованого стресу у перерозподілі лейкоцитів в цілому. Під впливом МСК нормалізувалась кількість всіх типів лейкоцитів, за виключенням лімфоцитів, вміст яких знижувався, але залишався достовірно вищим за такий у контрольних тварин. Вміст ВГЛ повертався до норми під впливом МСК і при гострому, і при пролонгованому стресі. Таким чином, претрансплантація МСК значно нівелювала стресові порушення в імунній системі.

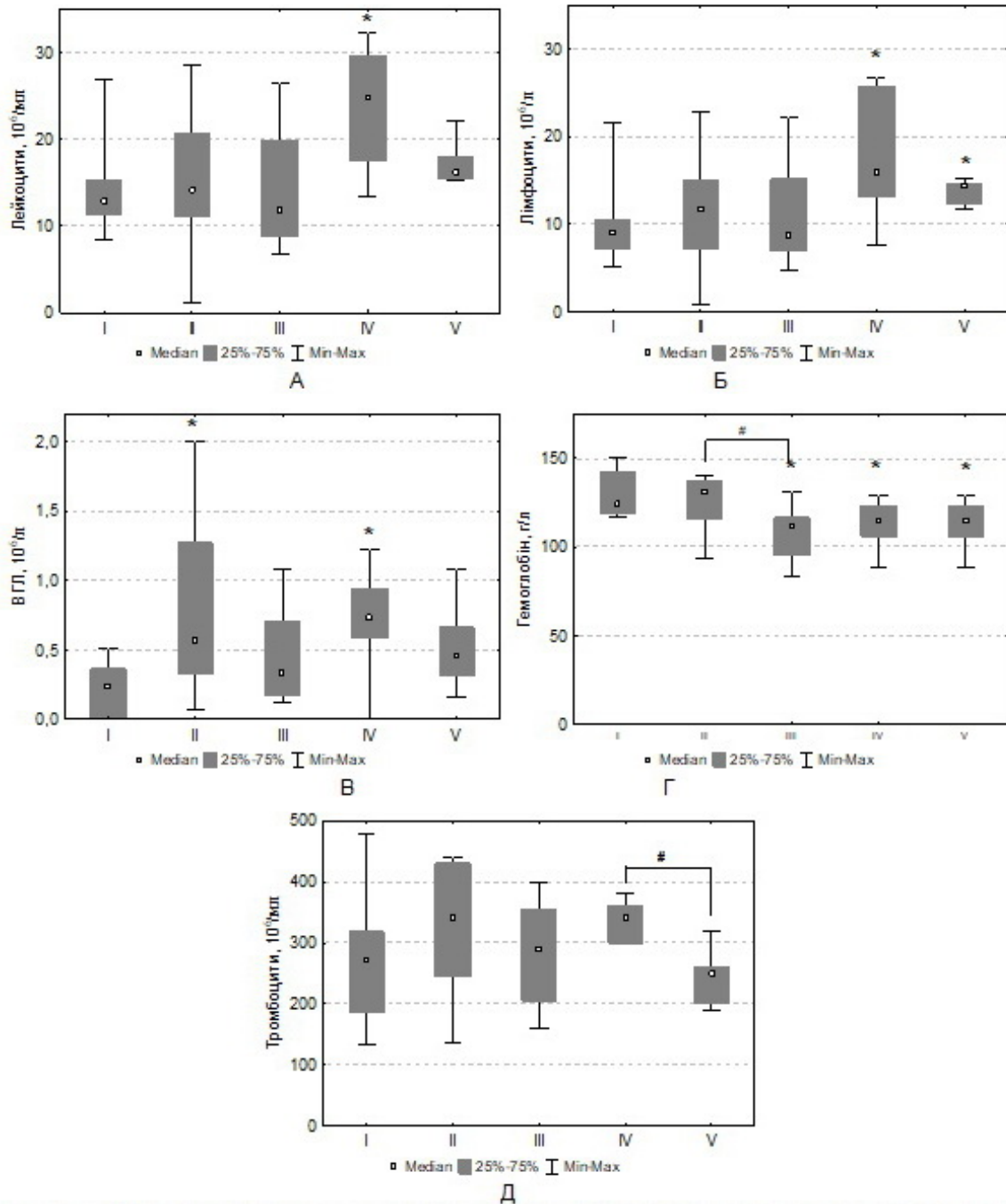


Рис 3. Кількість лейкоцитів (А), лімфоцитів (Б), ВГЛ (В), гемоглобіну (Г) і тромбоцитів (Д) у стресованих щурів

Групи: I (контрольна) – нормальні щури, II – щури яким відтворювали гострий стрес, III – щури яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали гострий стрес,

IV – щури яким відтворювали пролонгований стрес, V – щури яким вводили МСК кісткового мозку і відтворю-

вали пролонгований стрес. * – $p < 0,05$ порівняно з групою контрольних тварин; # – $p < 0,05$ між групами.

Кількість гемоглобіну (рис. 3Г) значно знижувалась у щурів після пролонгованого стресу, і залишалась на такому рівні після введення МСК. При гострому стресі рівень гемоглобіну не знижувався, а після трансплантації МСК відбувалося зменшення його кількості. Таким чином, МСК негативно впливає на вміст еритроцитів і при гострому, і при пролонгованому стресі. При пролонгованому стресі за трансплантації МСК, значно знижувалась кількість у крові тромбоцитів (рис. 3Д). Із даних літератури відомо, що при хронічному стресі з підвищеною кількістю катехоламінів пригнічення еритроїдного кровотворення відбувається не дивлячись на підвищений рівень еритропоетину [8, 20]. При травматичному стресі пригнічується утворення еритроцитарних бурс-формуючих одиниць і гранулоцитарно-моноцитарних колонієутворюючих одиниць опосередковане продукцією стромальними клітинами кісткового мозку TGF-beta1. Пов'язане із стресом порушення ери-

тропоезу, так званий стресовий еритропоез може бути визваний активацією дендритних клітин 1-го типу [14]. Є дані про пригнічення еритропоезу при стресі підвищеною кількістю адреналіну [20].

Імунологічні дослідження показали, що природна цитотоксичність мононуклеарів периферичної крові, спленоцитів і клітин лімфатичних вузлів при гострому та пролонгованому стресі після введення МСК суттєво не змінювалась. Лише при гострому стресі показник цитотоксичності спленоцитів виявився достовірно нижчим, ніж у контрольних тварин. Трансплантація МСК не впливала суттєво на активність клітин із усіх лімфоїдних органів.

Проліферативна активність мононуклеарів периферичної крові (рис. 4А), спленоцитів і клітин лімфатичних вузлів в контрольній групі і в групах при різних видах стресу практично не відрізнялась. Але вона була суттєво нижчою при гострому стресі у групі з введенням МСК, які, таким чином, спричиняли відому і притаманну цим клітинам антипроліферативну дію [9].

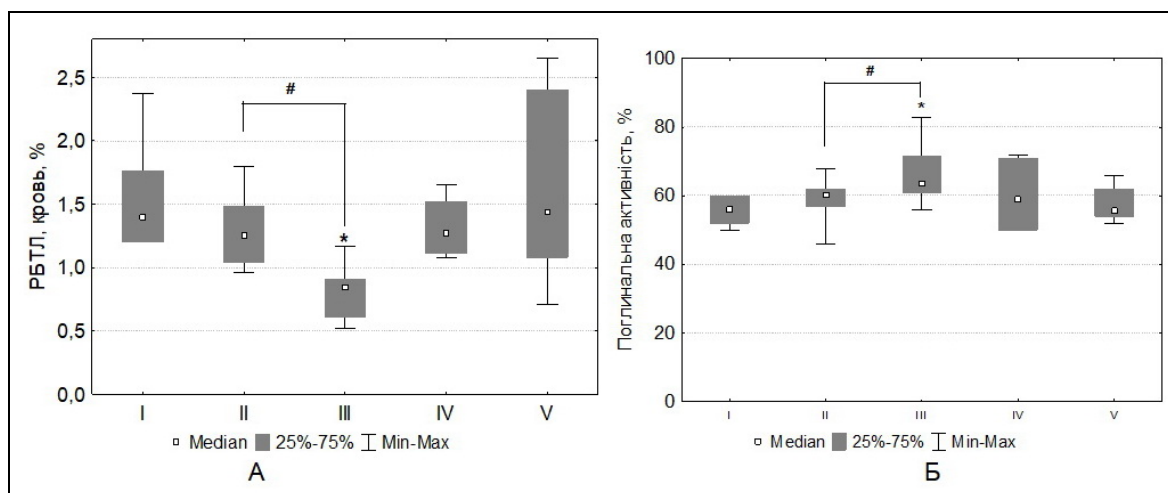


Рис 4. Проліферативна активність лімфоцитів периферичної крові (А), та поглинальна активність нейтрофілів (Б) стресованих щурів

Групи: I (контрольна) – нормальні щури, II – щури яким відтворювали гострий стрес, III – щури яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали гострий стрес, IV – щури яким відтворювали пролонгований стрес, V – щури яким вводили МСК кісткового мозку і відтворювали пролонгований стрес. * – $p < 0,05$ порівняно з групою контрольних тварин; # – $p < 0,05$ між групами.

Поглиналина активність нейтрофілів крові значно підвищувалась тільки після гострого стресу і трансплантації МСК (рис. 4Б).

Слід зазначити, що дія на організм гострого і пролонгованого стресів суттєво відрізнялась по розвитку виразкоутворення, змін відносної маси тимусу, клітинності тимусу і селезінки, вираженості лейкоцитозу, лімфоцитозу, кількості гемоглобіну і тромбоцитів. Найбільш виражені зміни спостерігались при пролонгованому стресі. Трансплантація МСК в більшій мірі впливала на вищезазначені показники при пролонгованому стресі в сторону їх нормалізації до рівня у контрольних тварин.

При пролонгованому стресі в результаті трансплантації МСК значно зменшувалась кількість і площа виразок, що свідчить про адаптивну протекторну дію клітин.

При гострому стресі введення МСК практично не впливало на виразкоутворення, що свідчить про більшу ефективність протекторної дії МСК, якщо вони поєднуються з адаптогенною дією пролонгованого стресу. При гострому стресі збільшувалась відносна вага тимусу і знижувалась його клітинність. При пролонгованому стресі відносна вага тимусу знижувалась не суттєво, і також знижувалась клітинність органу. При гострому стресі введені МСК нормалізували відносну масу і клітинність тимусу, а при пролонгованому стресі суттєво сприяли підвищенню клітинності тимусу. В усіх групах відносна вага селезінки зменшувалась. Клітинність селезінки найбільше і суттєво зменшувалась при пролонгованому стресі, а при введенні таким тваринам МСК відбулось значне збільшення показника, що свідчить про регенеративну дію попередньо введених МСК.

Отримані дані свідчать про регенеративну дію МСК при стресі. На відміну від гострого стресу, при пролонгованому стресі спостерігався виражений лейкоцитоз та лімфоцитоз. ВГЛ-цитоз був і при гострому і при пролонгованому стресі. Під впливом трансплантованих МСК кількість всіх мобілізованих клітин нормалізувалась, за виключенням лімфоцитів, кількість яких

продовжувала значно перевищувати рівень контрольних тварин. Вміст ВГЛ повертався до норми і при гострому, і при пролонгованому стресі. При пролонгованому стресі зменшувалася кількість гемоглобіну, а після трансплантації МСК вона знижувалась при гострому стресі. При пролонгованому стресі трансплантація МСК призводила до значного зниження кількості тромбоцитів, що свідчить про ефективний вплив МСК на різні ростки кровотворення при стресі.

Висновки

Трансплантація МСК кісткового мозку щурам перед відтворенням у них стресу підсилює адаптаційні анти-стресові механізми, які розвиваються при пролонгованому стресі, що призводить до пригнічення шлункового виразкоутворення і суттєво змінює показники активності імунної системи. Можна припустити, що одним із механізмів дії на організм МСК є сприяння формування адаптаційних реакцій.

Список використаних джерел:

- Особливості лейкоцитарної формули крові щурів за умов стрес-індукованих ерозивно-виразкових уражень шлунка та профілактичного введення меланіну / Д.В. Голишкін, Т.М. Фалалеева, Н.В. Чижанська та ін. // Укр. антарктичний журн., 2015. – № 14. – С. 180–184.
- Нежинская Г.И. Нейрономальные эффекты мускаринового антагониста в профилактике стресса / Д.В. Голишкін, Т.М. Фалалеева, Н.В. Чижанська та ін. // Эксперимент. и клиническая фармакология, 2008. – Т. 71, № 3. – С. 46–48.
- Структурно-функциональная организация костномозговых ниш гемопоэтических стволовых клеток / Д.В. Голишкін, Т.М. Фалалеева, Н.В. Чижанська та ін. // Клітинна та органна трансплантологія, 2016. – Т. 4, № 1. – С. 82–100.
- Скорородкина О.В. Роль цитокинов CD4+ лимфоцитов в патогенезе иммунного воспаления при язвенном колите / О.В. Скорородкина, О.Р. Валеева // Рос. аллергологич. журн., 2018. – Т. 15, № 1-2. – С. 103–105.
- Чеботарев В.Ф. Эндокринная регуляция иммуногенеза / В.Ф. Чеботарев. – К., 1979.
- The gastroprotective action of acidic mineral water from the Azhyg-Sug source on the stress-induced injuries to the stomach of white rats / K.D. Arakchaa, S.M. Salchak, Y.G. Razuvaeva et al. // Vopr. Kurortol. Fizioter. Lech. Fiz. Kult., 2019. – Vol. 96, N 2. – P. 54–60.
- Collagen Hydrolysis Products Reduce the Formation of Stress-Induced Ulcers by Regulating Stress-Associated Activation of the Neuroendocrine and Immune Systems / Z.V. Bakaeva, N.V. Ermakova, O.V. Mankaeva et al. // Bull Exp Biol Med., 2018. – Vol. 165, N 4. – P. 449–452.
- Chronic restraint stress after injury and shock is associated with persistent anemia despite prolonged elevation in erythropoietin levels / L.E. Bible, L.V. Pasupuleti, A.V. Gore et al. // J. Trauma Acute Care Surg., 2015. – Vol. 79, N 1. – P. 91–96.
- Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells / F. Bifari, V. Lisi, E. Mimiola et al. // Transfus. Med. Hemother., 2008. – Vol. 35, N 3. – P. 194–204.
- Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury / P. Chang, Y. Qu, Y. Liu et al. // Cell Death Dis., 2013. – N 4. – e685. doi: 10.1038/cddis.2013.178.
- Gastroprotective role of glucocorticoid hormones / L. Filaretova, T. Podvigina, T. Bagaeva et al. // J. Pharmacol. Sci., 2007. – Vol. 104, N 3. – P. 195–201.
- Effect of cold stress on immunity in rats / G.Z. Hu, S.J. Yang, W.X. Hu et al. // Exp. Ther. Med., 2016. – Vol. 11, N 1. – P. 33–42.
- Hao H., Chen G., Liu J. et al. Culturing on Wharton's jelly extract delays mesenchymal stem cell senescence through p53 and p16INK4a/pRb pathways / H. Hao, G. Chen, J. Liu et al. // PLoS One, 2013. – Vol. 8, N 3. – e58314. doi: 10.1371.
- Stress-associated erythropoiesis initiation is regulated by type 1 conventional dendritic cells / T.S. Kim, M. Hanak, P.C. Trampont, T.J. Braciale // J. Clin. Invest., 2015. – Vol. 125, N 10. – P. 3965–3980.
- Transplantation of mesenchymal stem cells to prevent radiation-induced intestinal injury in mice / K. Kudo, Y. Liu, K. Takahashi et al. // J. Radiat. Res., 2010. – Vol. 51, N 1. – P. 73–79.
- Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells iso-lated from low volume of human bone marrow / G. Kundrotas, E. Gasperskaja, G. Slapsyte et al. // Oncotarget., 2016. – Vol. 7, N 10. – P. 10788–10802. doi: 10.18632/oncotarget.7456.
- Le Blanc K. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system / K. Le Blanc, D. Mougiakakos // Nat. Rev. Immunol., 2012. – Vol. 12, N 5. – P. 383–396.

- Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture / V. Nikitina, T. Astrelina, V. Nugis et al. // PLoS One, 2018. – Vol. 13, N 2. – e0192445. doi: 10.1371.
- Effects of tofisopam on the physiological changes induced by stress loading and hypothalamic stimulation / H. Ohnishi, C. Ito, K. Suzuki et al. // Nihon. Yakurigaku Zasshi., 1981. – Vol. 78, N 3. – P. 139–144.
- Dose-response relationship between norepinephrine and erythropoiesis: evidence for a critical threshold / A. Penn, A.M. Mohr, S.G. Shah et al. // J. Surg. Res., 2010. – Vol. 163, N 2. – e85–90. doi: 10.1016/j.jss.2010.03.051.
- Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice / S. Saha, P. Bhanja, R. Kabariti et al. // PLoS. One, 2011. – Vol. 6, N 9. – e24072. doi: 10.1371/journal.pone.0024072.
- Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury / A. Sémont, S. François, M. Mouisseddine et al. // Adv Exp Med Biol., 2006. – Vol. 585. – P. 19–30.
- Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation / Y. Wang, Z. Zhang, Y. Chi et al. // Cellio Death Dis., 2013. – Vol. 4. – e950. doi: 10.1038/cddis.2013.480.
- Comparative proteomic analysis of rats subjected to water immersion and restraint stress as an insight into gastric ulcers / Z.R. Zhou, P. Huang, G.H. Song et al. // Mol Med Rep., 2017. – Vol. 16, N 4. – P. 5425–5433.

References (Scopus):

- Golyshkin DV, Falalyeyeva TM, Chyzhanska NV, Beregova TV, Ostapchenko LI. White blood count of rats under stress-induced stomach lesions and the prophylactic administration of melanin. Ukrainian Antarctic Journal. 2015;14:180–4.
- Nezhinskaya GI, Vadykin AL, Sapronov NS. Non-neuronal effects of muscarinic antagonists in stress prophylaxis. Experimental and Clinical Pharmacology. 2008;71(3):46–8.
- Nikolskaya E.I., Butenko G.M. Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches // Cell and Organ Transplantation. 2016;4(1):101–17.
- Skorokhodkina OV, Valeeva OR. The role of cytokines CD4 + lymphocytes in the pathogenesis of immune inflammation in ulcerative colitis. Russian Allergy Journal. 2018;15(1-2):103–5.
- Chebotarev VF. Endocrine regulation of immunogenesis. Kiev, 1979.
- Arakchaa KD, Salchak SM, Razuvaeva YG, Toropova AA, Smirnova IN, Nikolayev SM, et al. The gastroprotective action of acidic mineral water from the Azhyg-Sug source on the stress-induced injuries to the stomach of white rats. Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult. 2019;96(2):54–60. doi: 10.17116/kurortol20199602154.
- Bakaeva ZV, Ermakova NV, Mankaeva OV, Sveshnikov DS, Severin AE, Sine'nikova AN, et al. Collagen Hydrolysis Products Reduce the Formation of Stress-Induced Ulcers by Regulating Stress-Associated Activation of the Neuroendocrine and Immune Systems. Bull Exp Biol Med. 2018;165(4):449–52. doi: 10.1007/s10517-018-4191-x.
- Bible LE, Pasupuleti LV, Gore AV, Sifri ZC, Kannan KB, Mohr AM. Chronic restraint stress after injury and shock is associated with persistent anemia despite prolonged elevation in erythropoietin levels. J Trauma Acute Care Surg. 2015;79(1):91–6; discussion 96–7. doi: 10.1097/TA.0000000000000686.
- Bifari F, Lisi V, Mimiola E, Pasini A, Krampera M. Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells. Transfus Med Hemother. 2008;35(3):194–204.
- Chang P, Qu Y, Liu Y, Cui S, Zhu D, Wang H, et al. Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury. Cell Death Dis. 2013;4:e685. doi: 10.1038/cddis.2013.178.
- Filaretova L, Podvigina T, Bagaeva T, Bobryshev P, Takeuchi K. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones. J Pharmacol Sci. 2007;104(3):195–201.
- Hu GZ, Yang SJ, Hu WX, Wen Z4, He D, Zeng LF, et al. Effect of cold stress on immunity in rats. Exp Ther Med. 2016;11(1):33–42.
- Hao H., Chen G., Liu J. et al. Culturing on Wharton's jelly extract delays mesenchymal stem cell senescence through p53 and p16INK4a/pRb pathways. PLoS One. 2013;8(3):e58314. doi: 10.1371.
- Kim TS, Hanak M, Trampont PC, Braciale TJ. Stress-associated erythropoiesis initiation is regulated by type 1 conventional dendritic cells. J Clin Invest. 2015;125(10):3965–80. doi: 10.1172/JCI81919.
- Kudo K, Liu Y, Takahashi K, Tarusawa K, Osanai M, Hu DL, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to prevent radiation-induced intestinal injury in mice. J Radiat Res. 2010;51(1):73–9.
- Kundrotas G., Gasperskaja E., Slapsyte G. et al. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells iso-lated from low volume of human bone marrow. Oncotarget. 2016;7(10):10788–802. doi: 10.18632/oncotarget.7456.
- Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. Nat Rev Immunol. 2012;12(5):383–96. doi: 10.1038/nri3209.

18. Nikitina V., Astrelina T., Nugis V. *et al.* Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192445. doi: 10.1371

19. Ohnishi H, Ito C, Suzuki K, Niho T, Shimura M, Yamaguchi K. Effects of tofisopam on the physiological changes induced by stress loading and hypothalamic stimulation *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1981;78(3):139-44.

20. Penn A, Mohr AM, Shah SG, Sifri ZC, Kaiser VL, Rameshwar P, *et al.* Dose-response relationship between norepinephrine and erythropoiesis: evidence for a critical threshold. *J Surg Res*. 2010;163(2):e85-90. doi: 10.1016/j.jss.2010.03.051.

21. Saha S, Bhanja P, Kabarriti R, Liu L, Alfieri AA, Guha C. Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One*. 2011;6(9):e24072. doi: 10.1371/journal.pone.0024072.

22. Sémont A, François S, Mouisseddine M, François A, Saché A, Frick J, *et al.* Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal

epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. *Adv Exp Med Biol*. 2006;585:19-30.

23. Wang Y., Zhang Z., Chi Y. *et al.* Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis*. 2013;4:e950. doi: 10.1038/cddis.2013.480.

24. Zhou ZR, Huang P, Song GH, Zhang Z, An K, Lu HW, *et al.* Comparative proteomic analysis of rats subjected to water immersion and restraint stress as an insight into gastric ulcers. *Mol Med Rep*. 2017;16(4):5425-5433. doi: 10.3892/mmr.2017.7241.

Надійшла до редколегії 07.10.19

Отримано виправлений варіант 08.11.19

Підписано до друку 08.11.19

Received in the editorial 07.10.19

Received revised version on 08.11.19

Signed in the press on 08.11.19

Я.-М. Семенова, мл. науч. сотр., И. Никольский, д-р биол. наук., проф.

ГУ "Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины", Киев, Украина,

Л. Остапченко, д-р биол. наук, проф.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

УГНЕТЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ЯЗВ ЖЕЛУДКА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ ВОДОИММЕРСИОННОМ СТРЕССЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Исследовано влияние предварительной трансплантации мультипотентных стромальных клеток (МСК) костного мозга на образование язв желудка и состояние иммунной системы в условиях острого и пролонгированного стрессов. У крыс линии Вистар воспроизвели иммобилизационный водоиммерсионный стресс 2 типов: острый и пролонгированный. Исследовали количество и площадь стрессовых язв, показатели тимуса и селезенки, а также гематологические показатели, пролиферативную и цитотоксическую активность мононуклеаров периферической крови, спленоцитов и клеток лимфатических узлов, определяли поглотительную активность нейтрофилов. При пролонгированном стрессе в результате трансплантации МСК значительно уменьшалось количество и площадь язв, что свидетельствует об адаптивном протекторном действии клеток. При остром стрессе введение МСК практически не влияло на язвообразование. При пролонгированном стрессе наблюдалось снижение клеточности тимуса, селезенки и увеличение количества лейкоцитов в крови. Под влиянием трансплантированных МСК нормализовалось количество всех мобилизованных клеток, исключая лимфоциты. Естественная цитотоксичность и пролиферативная активность спленоцитов, клеток лимфатических узлов и периферической крови при остром и пролонгированном стрессе в результате введения МСК существенно не менялась. В результате введения МСК костного мозга за 24 ч до последнего воспроизведения стрессовых реакций в модели пролонгированного стресса значительно уменьшалось количество и площадь язв, что в целом свидетельствует о противоязвенном действии клеток, и нормализовались вызванные стрессом количественные клеточные изменения в иммунной системе. Трансплантация МСК костного мозга крысам перед воспроизведением у них стресса, усиливает адаптационные антистрессовые механизмы, которые развиваются при пролонгированном стрессе, что приводит к подавлению образования язв желудка и существенно изменяет показатели активности иммунной системы. Можно предположить, что одним из механизмов действия на организм МСК является способствование формированию адаптационных реакций.

Ключевые слова: водоиммерсионный холодовой стресс, иммунная система, мультипотентные стромальные клетки, трансплантация.

Y.-M. Semenova, Junior Res., I. Nikolsky, Dr. Sci. Prof.

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

L. Ostapchenko, Dr.Sci. Prof.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ACCESSION OF FORMATION OF GASTRIC ULCERS UNDER IMMOBILIZATION OF WATER-IMMERSION STRESS OF PRELIMINARY TRANSPLANTATION MULTIPOTENT STROMAL CELL

To investigate the effect of pre-transplantation of multipotent stromal cells (MSCs) of bone marrow on gastric ulcer formation and the state of the immune system in conditions of acute and prolonged stress. Wistar rats reproduced immobilizing water-immersion stress of 2 types: acute and prolonged. Investigated the number and area of stress ulcers, thymus and spleen, as well as hematologic parameters, proliferative and cytotoxic activity of peripheral blood mononuclear cells, splenocytes and cells of lymph nodes, determined the absorption activity of neutrophils. With prolonged stress as a result of MSC transplantation, the number and area of ulcers significantly decreased, indicating the adaptive protective effect of cells. With acute stress, the introduction of MSC had virtually no effect on ulcer formation. With prolonged stress, there was a decrease in thymus, spleen and leukocyte counts in the blood. Under the influence of transplanted MSCs, the number of all mobilized cells was normalized with the exception of lymphocytes. The natural cytotoxicity and proliferative activity of splenocytes, cells of lymph nodes and peripheral blood in acute and prolonged stress as a result of the introduction of MSC did not change significantly. The introduction of bone marrow MSC 24 h before the last reproduction of stress responses in the model of prolonged stress significantly reduced the number and area of ulcers, which generally indicates the anti-ulcer effect of cells, and normalized the stress-induced quantitative cellular changes in the immune system. Transplantation of bone marrow MSCs to rats prior to reproduction of stress enhances the adaptive antistress mechanisms that develop during prolonged stress, leading to suppression of gastric ulcer formation and significantly altering immune system activity. It can be assumed that one of the mechanisms of action on the body of MSCs is to promote the formation of adaptive responses.

Keywords: water-immersion cold stress, immune system, multipotent stromal cells, transplantation.