

ОПТИМІЗАЦІЯ ГЕМОПОЕЗУ АНТЕНАТАЛЬНО ОПРОМІНЕНОГО ПОТОМСТВА ЩУРІВ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КЛІТИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

Романова О.А., Сидоренко Т.А., Ігумнова Н.І., Юхименко В.І.

Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України

За теперішнього часу широко застосовується заміщувальна клітинна терапія, ефективна при відновленні гемопоезу та імунітету у пацієнтів після хіміо- та радіотерапії, а також тих, що потерпають від спадкових дефектів метаболізму, недостатності кровотворення, первинних імунодефіцитів. У таких випадках лікування зводиться до пересадки стовбурових клітин і формування стійких паростків здорової донорської тканини, а також стимуляції відновлення клітинного резерву реципієнта [1, 2]. Такий терапевтичний ефект, як вважається, пов'язаний з ростовими факторами, цитокінами та іншими сигнальними молекулами, здатними активізувати регенерацію і приживання клітин в організмі реципієнта. Зокрема, в наших попередніх роботах доводиться регуляторний ефект гуморальних факторів сироватки імуноглобулінової та неімуноглобулінової природи на процес відновлення кісткового мозку у ситуації сингенної лімфомієлотрансплантації летально опроміненим реципієнтам [3]. Базуючись на цих даних, можна припустити, що донорські клітини, і зокрема мієлокаріоцити (а саме – стовбурові кровотворні клітини і клітини мікрооточення) можуть не тільки відновлювати дефіцитний гемопоез шляхом стимулу регенерації клітин реципієнта, але й мають здатність регулювати порушення молекулярного і клітинного гомеостазу.

Це видається особливо актуальним для корекції патологічних змін у системі кровотворення, що були виявлені нами у новонароджених, опромінених низькими дозами радіації в антенатальному періоді [4]. Виходячи з цього, *метою* даного дослідження було вивчення впливу алогенного клітинного мієлотрансплантату у субтрансплантаційних дозах на нормалізацію гемопоезу потомства, опроміненого в ранньому ембріональному періоді.

Матеріал та методи досліджень

Дослідження проведено на щурах популяції Вістар. Для одержання нащадків відбирали самиць двохмісячного віку, першонароджуючих, з масою 200 – 250 г, та самців того ж віку. На третю добу вагітності самиць одноразово опромінювали на установці РУМ-17 дозою 0,5 Гр, після чого повертали до віварію і тримали у звичайних умовах. Одночасно з дослідною групою формували контрольну групу неопромінених вагітних самиць. Після народження потомства самиць з приплодом розсаджували в окремі клітки.

Антенатально опроміненим новонародженим щурятам 7-добового віку трансплантували клітини кісткового мозку від інтактних щурів тої ж популяції і віку. Клітини кісткового мозку щурів отримували шляхом вимивання зі стегнових кісток розчином живильного середовища 199 (Росія), що містив 0,2 % цитрата натрію. Ін'єкцію мієлокаріоцитів здійснювали під капсулу селезінки. Були сформовані такі групи тварин: 1) антенатально опромінені реципієнти кісткового мозку, що отримали $3,0 \times 10^4$ клітин; 2) антенатально опромінені реципієнти кісткового мозку, що отримали $1,5 \times 10^4$ клітин; 3) тільки антенатально опромінені щурята таких самих популяції і віку; 4) інтактні щурята таких самих популяції і віку.

Оцінка гемопоетичного статусу опромінених реципієнтів мієлокаріоцитів здійснювалась за їх мієлограмами, складу периферичної крові – за лейкограмами, за допомогою традиційних цитологічних методів.

Статистичний аналіз результатів дослідження проводили з використанням параметричних показників середнього арифметичного та середнього квадратичного відхилення. Достовірність різниці між показниками різних груп оцінювали за критерієм Ст'юдента і вважали значимою при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Вивчення цитограм кісткового мозку антенатально опромінених реципієнтів кістковомозкових клітин показало, що динамічніше нормалізація всіх паростків кровотворення протікає у тварин, які отримали нижчу дозу мієлокаріоцитів (табл. 1). Так, вміст у їх кістковому мозку нейтрофільних гранулоцитів, як паличко-, так і сегментоядерних, на 14-ту післянатальну добу, тобто через тиждень після трансплантації, дорівнює частці цих клітин у інтактних тварин такого ж віку, що є характерним також для групи тільки опромінених тварин. Але на 30-ту добу, коли у опромінених щурів спостерігається зниження частки сегментоядерних нейтрофілів, у групі реципієнтів ($1,5 \times 10^4$) мієлокаріоцитів їх вміст не відрізняється від фізіологічного.

Стосовно опромінених тварин, які отримали більшу дозу мієлокаріоцитів, можна зазначити, що на 14-ту добу після народження загальний вміст клітин мієлоїдного паростку їх кісткового мозку значно перевищує такий як у тільки опромінених, так і у інтактних тварин. Проте, при збільшенні частки паличкоядерних клітин у порівнянні з контрольною інтактною групою, має місце значне (більше, ніж у два рази) зниження кількості сегментоядерних клітинних форм порівняно з обома контрольними групами (тільки опромінених і інтактних тварин). На 30-ту післянатальну добу у реципієнтів більш високої дози спостерігається різке падіння вмісту як паличко-, так і сегментоядерних клітин, тягнучи за собою зменшення загального вмісту мієлоїдних клітин у кістковому мозку порівняно з обома контрольними групами.

Щодо клітин мієлоїдного паростку слід також зазначити, що на всіх досліджених етапах в обох групах реципієнтів мієлокаріоцитів має місце достовірне зниження продукції еозинофільних клітин у порівнянні з опроміненими щурами, у яких підвищення виробки еозинофілів кістковим мозком є одною з яскравих патологічних рис. Проте, у групі реципієнтів вищої дози кістковомозкових клітин на 30-ту добу після народження частка еозинофілів достовірно перевищує їх вміст у групі інтактних тварин, тоді як реципієнти ($1,5 \times 10^4$) клітин кісткового мозку (ККМ) демонструють повну нормалізацію цього показника клітинного складу кісткового мозку.

Продукція еритробластів та пронормоцитів на 14-ту добу післянатального життя щурів-реципієнтів ККМ обох груп достовірно переважає виробку цих клітин у нормальних інтактних особин того ж віку, повністю наслідуючи цю тенденцію у опромінених тварин, яким не було пересаджено клітини. Але серед більш дозрілих клітин еритроїдного паростку спостерігається протилежна картина – вміст оксифільних нормоцитів у тварин, що отримали дозу ($1,5 \times 10^4$) ККМ значно перевищує їх частку у контрольних групах, а у реципієнтів ($3,0 \times 10^4$) ККМ він достовірно нижчий за неї. Проте, на 30-ту добу після народження ця закономірність змінюється: нормалізуючись у тварин-реципієнтів меншої дози ККМ, у другій групі дослідних щурів вміст цих клітин виявляється більшим навіть за їх кількість у тільки опромінених щурів.

Загальний вміст клітин лімфоцитарного паростку кісткового мозку на 14-ту добу життя тварин-реципієнтів ККМ обох дослідних груп достовірно менший, ніж у щурів обох контрольних груп того ж віку. При цьому при більш високій продукції юних форм лімфоїдних клітин у дослідних групах, ніж у контрольних, вміст всіх лімфоїдних клітин у кістковому мозку реципієнтів ККМ виявляється нижчим, ніж у контролі. На наш погляд, це може бути обумовлено реакцією ТПХ, яка на ранній стадії після алогенної

трансплантації ККМ у реципієнтів є більш вираженою, що скісно було підтверджено результатами гістологічного дослідження їх селезінки. Зрозуміло, що це може бути причиною загибелі частини клітин у всіх паростках кровотворення. Вірогідно, що РТПХ при трансплантації алогенних ККМ у субтрансплантаційних дозах має транзиторний характер, про що свідчить нормалізація вмісту клітин лімфомієлоїдного паростку (лімфоцитів і моноцитів) у 30-ти добових тварин, які отримали ($1,5 \times 10^4$) клітин кісткового мозку. Звертає на себе увагу також зниження частки плазмоцитів у реципієнтів малої дози ККМ у порівнянні з опроміненими і навіть з інтактними тваринами. Проте, у тварин, які отримали ($3,0 \times 10^4$) ККМ, при надвисокій продукції лімфобластних клітин, вихід більш дозрілих клітинних елементів у цей термін був достовірно нижчим, ніж у здорових тварин, дорівнюючи вмісту лімфоцитів у опромінених щурів. Окрім цього, меншою, ніж в інтактній контрольній групі, у реципієнтів вищої дози мієлокаріоцитів виявилась також частка моноцитарних клітин.

Таким чином, можна вивести, що з двох застосованих з метою нормалізації змінених параметрів гемопоезу у антенатально опроміненого потомства доз мієлокаріоцитів оптимальнішою виявилась нижча – ($1,5 \times 10^4$) клітин. Використовуючи алогенну трансплантацію ККМ у цій дозі, вже через 3 тижні у ембріонально опромінених тварин можемо спостерігати нормалізацію вмісту майже всіх більш дозрілих форм у паростках кровотворення. Більш висока доза уведених клітин виявилась мало ефективною для регуляції зміненого кровотворення. Очевидно, причиною цього є потужніша РТПХ, яка на етапі 30-ої доби у реципієнтів $3,0 \times 10^4$ мієлокаріоцитів все ще триває. Проте можна припустити, що вона, маючи транзиторний характер, закінчується на більш пізніх строках післянатального розвитку і може мати такі ж переконливі, а, можливо, і стійкіші результати. Привертає увагу також раннє та швидке відновлення до фізіологічного рівня гранулоцитів у кістковому мозку при застосуванні дози клітин ($3,0 \times 10^4$).

Дослідження динаміки становлення показників крові антенатально опромінених реципієнтів кісткового мозку також засвідчило, що на 30-ту добу дослідження вони досягають фізіологічного рівня тільки у тварин, які отримали нижчу дозу ККМ (табл.).

При цьому для реципієнтів обох груп на 14-ту післянатальну добу характерною є присутність юних форм ядромістких клітин у периферичній крові. Очевидно, причиною цього є надвисока продукція клітин всіх паростків кісткового мозку на цей час. На 30-ту добу у тварин першої групи бласти зникають з циркуляції, тоді як у реципієнтів ($3,0 \times 10^4$) ККМ продовжує реєструватись їх певна кількість (лімфобласти, монобласти).

Окрім того, частка паличко- та сегментоядерних нейтрофілів і лімфоцитів у реципієнтів більш високої дози ККМ наприкінці дослідження достовірно нижча від норми.

Привертає увагу відсутність еозинофілів у реципієнтів першої групи на 30-ту добу дослідження, а також плазмоцитів у периферичній крові реципієнтів обох груп.

Таким чином, можна зазначити, що більш динамічно під впливом трансплантації алогенних мієлокаріоцитів відбувається нормалізація кровотворення у реципієнтів, які отримали дозу ($1,5 \times 10^4$) клітин.

Застосування менших, порівняно зі стандартно використовуваними, доз галогенних клітин кісткового мозку є ефективним засобом корекції зміненого гемопоезу новонароджених, що зазнали опромінення в ембріональному періоді. Очевидно, стовбурові клітини і диференційовані мієлокаріоцити, що продукують широкий спектр диференціальних, ростових факторів та медіаторів, можуть здійснювати не тільки замісну і стимулювальну, але і регуляторну функцію, нормалізуючи не лише недостатність, але і патологічне перевищення продукції клітин крові.

Висновки

1. Нормалізація всіх параметрів кровотворення відбувається динамічніше у антенатально опромінених щурів, що отримали нижчу дозу алогенних міелокаріоцитів ($1,5 \times 10^5$ клітин).
2. Загальний вміст клітин міелоїдного паростку у реципієнтів дози $1,5 \times 10^5$ відновлюється на 14-ту добу, клітинний склад – на 30-ту добу; вміст клітин еритроїдного паростку і його клітинний склад – на 30-ту добу; вміст клітин лімфо-моноцитарного паростку нормалізується на 30-ту добу. У протилежність цьому у реципієнтів дози $3,0 \times 10^5$ з усіх вивчених параметрів відбувається відновлення загального вмісту клітин лише в еритроїдному паростку – на 14-ту післянатальну добу.
3. У кістковому мозку обох груп реципієнтів міелокаріоцитів 14-добового віку спостерігається достовірне зниження продукції еозинофільних клітин у порівнянні з опроміненими тваринами ($p < 0,05$). На 30-ту післянатальну добу у реципієнтів дози $1,5 \times 10^5$ відбувається нормалізація частки еозинофілів.
4. Відносний вміст лімфоцитів у кістковому мозку у реципієнтів дози $1,5 \times 10^5$ клітин відновлюється до фізіологічного рівня на 30-ту добу дослідження.
5. Показники периферичної крові (лейкограма) досягають фізіологічного рівня у 30-добових реципієнтів алогенних міелокаріоцитів в дозі $1,5 \times 10^5$.

Таблиця - Лейкограма периферичної крові антенатально опромінених реципієнтів клітин кісткового мозку (%)

Показники	Групи	Вік тварин (доба)	
		14	30
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Паличкоядерні лейкоцити	D ₁	3,5±0,9***	6,6±1,0
	D ₂	5,2±1,1	2,3±0,6***
	K ₁	5,0±0,4	5,1±0,3
	K ₂	4,5±1,0	6,3±1,4
Сегментоядерні лейкоцити	D ₁	13,5±1,8**	17,4±1,8*
	D ₂	5,7±1,1***	7,3±1,2***
	K ₁	14,1±1,0	13,1±0,9
	K ₂	15,2±1,9	17,3±2,4
Міелоцити	D ₁	6,2±1,2***	-
	D ₂	-	-
	K ₁	-	-
	K ₂	-	-
Мієлобласти	D ₁	1,0±0,5***	-
	D ₂	1,2±0,5***	-
	K ₁	-	-
	K ₂	-	-
Еозинофіли	D ₁	- ***	0,4±0,001***
	D ₂	- ***	0,16±0,001***
	K ₁	3,1±0,2	5,1±0,3
	K ₂	1,2±0,5	-
Лімфоцити	D ₁	38,7±3***	70,0±3,7
	D ₂	22,5±2,3***	48,5±3,1***
	K ₁	53,1±4,2	65,1±5,0
	K ₂	61,2±3,91	67,6±4,7
Пролімфоцити	D ₁	9,0±1,5***	2,0±0,6***
	D ₂	19,0±2,1***	9,1±1,3***
	K ₁	7,2±0,6	4,1±0,2
	K ₂	6,5±1,2	3,3±1,0

Лімфобласти	D ₁	14,5±1,9***	- ***
	D ₂	24,5±2,5***	20,3±2,0***
	K ₁	5,2±0,4	4,0±0,3
	K ₂	-	0,3±0,001
Моноцити	D ₁	5,7±1,1***	4,6±0,9
	D ₂	3,0±0,8***	5,5±1,0*
	K ₁	9,1±0,7	4,0±0,2
	K ₂	8,0±0,7	5,0±1,2
Промоноцити	D ₁	2,7±0,8***	-
	D ₂	4,7±1,1***	5,1±1,0***
	K ₁	-	-
	K ₂	-	-
Монобласти	D ₁	-	-
	D ₂	6,7±1,3	-
	K ₁	-	-
	K ₂	-	-
Плазмоцити	D ₁	2,7±0,8***	-
	D ₂	0,75±0,4***	-
	K ₁	4,0±0,3	0,04±0,003
	K ₂	1,7±0,6	-
Плазмобласти	D ₁	6,2±1,2***	-
	D ₂	-	-
	K ₁	-	-
	K ₂	-	-

Примітки: D₁ – дослідна група реципієнтів ККМ (1,5x10⁴);
D₂ – дослідна група реципієнтів ККМ (3,0x10⁴);
K₁ – антенатально опромінені тварини;
K₂ – інтактні тварини

Список літератури

1. Репин В.С. Трансплантация клеток: новые реальности в медицине // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1998. – Т. 126. – С. 14-28.
2. Gratwohl A., Hermans F., Baldmero H. et al. Hematopoietic cell transplantation // Br. Haematol. – 1996. – Vol. 92. – Н. 35-43.
3. Романова Е.А. Роль факторов сыворотки в регенерации костного мозга после облучения и миелотрансплантации // Вестник Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. – 2003. - № 597, вып. 6. – С. 32-36.
4. Романова Е.А., Коляда Т.И., Сидоренко Т.А. и др. Становление лимфомиелоидного комплекса у новорожденных крыс, подвергшихся облучению в доимплантационный период эмбриогенеза // Тавр. мед.-биол. вестник. – 2004. – Т. 7, № 1. – С. 118-122.

УДК 57.083.3:618.14-002

ОПТИМІЗАЦІЯ ГЕМОПОЕЗУ АНТЕНАТАЛЬНО ОПРОМІНЕНОГО ПОТОМСТВА ЩУРІВ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КЛІТИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

Романова О.А., Сидоренко Т.А., Ігумнова Н.І., Юхименко В.І.

Метою дослідження було вивчення впливу алогенного клітинного мієлотрансплантату у субтрансплантаційних дозах ($1,5 \times 10^4$ та $3,0 \times 10^4$ клітин) на гемопоез щурів, опромінених в ранньому ембріональному періоді. Визначено, що оптимальною для нормалізації змінених параметрів гемопоезу цих особин є більш низька з досліджених доз мієлокариоцитів. Показано, що клітинний кістковомозковий трансплантат може бути застосований з метою регуляції патологічно зміненого кровотворення.

УДК 57.083.3:618.14-002

ОПТИМИЗАЦИЯ ГЕМОПОЕЗА КРЫС, АНТЕНАТАЛЬНО ОБЛУЧЕННОГО ПОТОМСТВА КРЫС С ПРИМЕНЕНИЕМ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
Романова Е.А., Сидоренко Т.А., Игумнова Н.И., Юхименко В.И.

Целью исследования явилось изучение влияния аллогенного клеточного миелотрансплантата в субтрансплантационных дозах ($1,5 \times 10^4$ и $3,0 \times 10^4$ клеток) на гемопоез крыс, облученных в раннем эмбриональном периоде. Установлено, что оптимальной для нормализации измененных параметров гемопоеза этих особей является более низкая из исследованных доз миелокариоцитов. Показано, что клеточный костномозговой трансплантат может применяться с целью регуляции патологически измененного кроветворения.

UDC 57.083.3:618.14-002

OPTIMIZATION OF HEMOPOIESIS OF ANTENATALY IRRADIATION POSTERITY OF RATS BY APPLICATION OF CELLULAR TRANSPLANTATION

Romanova E.A., Sidorenko T.A., Igymnova N.I., Yuchimenko V.I.

The aim of study is influence of allogenic cellular myelotransplant in the subtransplantation doses ($1,5 \times 10^4$ and $3,0 \times 10^4$ cells) to the hemopoiesis of rats, which were irradiated in the early embryonic period. It was found out that less dose of mielocaryocytes was more effective for normalization of hemopoietic variational parametess. It was shown that cellular bone marrow transplant may be apple with aim of regulation of pathologic hemopoiesis.