

УДК 611.013.35:612.119:612.59:612.35:616-001.28

С.С. Паляниця

ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПРОМЕНЕВОЇ ХВОРОБИ

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, м. Київ

Резюме. За умов експериментальної променевої хвороби доведено, що трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин фетального походження сприяє відновленню паростків кровотворення в легально опромінених тварин, при цьому змінюється перебіг променевої хвороби. Вбачається перспективним використан-

ня стовбурових клітин фетального походження для відновлення кровотворення в осіб з аплазією кісткового мозку.

Ключові слова: фетальна печінка, гемопоетичні клітини, променева хвороба, трансплантація.

Вступ. Ефективним засобом корекції порушень гемопоезу різної етіології є трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), джерелами яких є кістковий мозок, ембріональна печінка, периферична та кордова кров. Основним механізмом дії ГСК є репуляція трансплантованих клітин з утворенням нових осередків кровотворення. Подальша активна проліферація трансплантованих клітин призводить до прискореної регенерації кровотворного паростка, відновлення структури «червоної» та «білої» крові та імунної відповіді організму.

Трансплантація ГСК є одним із найголовніших компонентів у лікуванні променевої хвороби або наслідків впливу на організм (у т.ч. із лікувальною метою) іонізуючого опромінення, яке є травмою всіх органів та систем організму, особливо структури клітин, що активно діляться – кісткового мозку, лімфатичної системи, клітин шкіри, печінки та інших органів.

Основним джерелом ГСК, що використовуються в комплексному лікуванні гематологічного синдрому променевої хвороби, є кістковий мозок або периферична кров. Але існують багато чинників як технічного, так і медичного характеру, що зумовлюють певні труднощі при застосуванні кісткового мозку або гемопоетичних клітин периферичної крові.

Враховуючи те, що клітинна культура фетальної печінки має значний проліферативний потенціал та здатність до активної диференціації в гемопоетичному напрямку можливо як альтернативне джерело клітинного трансплантата використовувати ембріональну печінку [1-4].

Однак в існуючій науковій літературі обмаль інформації стосовно використання кріоконсервованих клітин фетальної печінки (на відміну від нативного трансплантата) в корекції гематологічного синдрому, що зумовлює проведення науково-дослідних робіт [5-7].

Мета дослідження. Визначити строки та динаміку відновлення кровотворення в тотально опромінених тварин після трансплантації кріоконсервованих гемопоетичних клітин ембріональної печінки.

Матеріал і методи. Дослідження проведено на кролях породи сірий велетень, середньою ма-

сою $1,50 \pm 0,12$ кг, які піддані тотальному опроміненню в дозі 1000 рентген протягом 32 хвилин на апараті Rocus.

Піддослідні тварини розподілені за групами: 1-а (контрольна) група – опромінені тварини (n-8); 2-а (дослідна) група – тварини (n-12), яким через 1 годину після опромінення уведена суспензія кріоконсервованих гемопоетичних клітин ембріональної печінки кролів.

Клітинний трансплантат отримували з ембріональної печінки кролів першого та другого триместру вагітності за допомогою розробленого та запатентованого методу [8]. Кріоконсервування проводили за оригінальною методикою з використанням 10 % розчину диметилсульфоксиду [9].

Клітинну трансплантацію проводили шляхом введення кріоконсервованих гемопоетичних клітин (середньою дозою $1,8 \times 10^8$ клітин) внутрішньовенно та внутрішньокістково в праву і ліву стегнові кістки.

У піддослідних тварин до опромінення, на 6, 12, 18, 60-у та 120-у добу після опромінення визначали показники периферичної крові, вміст в еритроцитах фетального гемоглобіну, а також клітинний склад кісткового мозку (кількість ядерних клітин, ретикулоцитів).

Визначення статмокінетичного індексу та цитогенетичний аналіз каріотипів проводили на 1-у та 60-у добу.

Периферичну кров у тварин отримували через пункцію вušних вен, а кістковий мозок (об'ємом до 0,7 мл) вилучали зі стегнових кісток. Мазки крові забарвлювали за методом Романовського-Гімзи, а визначення еритроцитів, що містять фетальний гемоглобін, проводили за методом Клейнгауера та Бетке.

Результати дослідження та їх обговорення. Аналіз результатів проведеного дослідження свідчив, що безпосередньо після іонізуючого опромінення у тварин підвищувалася температура тіла (у середньому на $3,9 \pm 0,7$ °C) та погіршувався загальний стан (млявість, адинамія, відмова від їжі, блювання).

Поступово, починаючи з другої доби спостереження, кролі контрольної групи втрачали масу тіла. Якщо до опромінення середня маса тіла складала в середньому $2,65 \pm 0,15$ кг, то через 6 та

12 діб – $2,30 \pm 0,17$ кг та $1,79 \pm 0,1$ кг ($p < 0,05$) відповідно.

Починаючи з третьої доби після опромінення, відмічено перші випадки загибелі піддослідних тварин, а на 12-у добу експерименту всі кролі контрольної групи загинули.

За даними лабораторних досліджень, вже на першу добу після опромінення у тварин були зафіксовані ознаки променевої хвороби, що проявлялось у вигляді патологічного зсуву показників периферичної крові. Вже на другу добу експерименту фіксували вірогідне ($P < 0,05$) зниження показників периферичної крові, крім еозинофілів та сегментоядерних нейтрофілів.

До третьої доби спостереження у тварин контрольної групи вміст гемоглобіну та відсоток ретикулоцитів зменшувався порівняно з відповідними показниками через одну добу після опромінення в 4 рази ($P < 0,05$), відмічено стійку тромбоцитопенію ($36,25 \pm 2,40 \times 10^{12}/л$ $P < 0,05$) та лейкопенію ($0,92 \pm 0,05 \times 10^9/л$ $P < 0,05$).

У мазках периферичної крові юні та паличкоядерні нейтрофіли відсутні. До шостої доби експерименту відмічали подальше погіршення стану периферичної крові та повну аплазію в кістковому мозку всіх паростків кровотворення.

Паталого-анатомічний розтин загиблих тварин підтвердив наявність типової променевої хвороби.

У головному мозку та мозкових оболонках виявлені обширні крововиливи, така ж картина спостерігається і в грудній порожнині. Сечовий міхур збільшений, переповнений сечею червоного кольору слизова оболонка сечового міхура покрита численними крововиливами.

У тварин основної групи після уведення клітинного трансплантата спостерігали більш помірний перебіг променевої хвороби. Тварини були більш активними та лише перші 24-36 годин після опромінення відмовлялися від їжі та пиття.

До 12-ї доби спостерігали незначну втрату тваринами маси, але на більш пізніх строках маса тіла кролів не відрізнялася від початкового рівня.

До 18-ї доби у тварин основної групи спостерігалися знижені гематологічні показники периферичної крові, крім значень сегментоядерних нейтрофілів та моноцитів, однак ці величини тільки в незначній мірі відрізнялися від показників крові неопромінених тварин.

Вже на 6-у добу в периферичній крові кроликів з'являється підвищений вміст клітин із фетальним гемоглобіном, а на 12-у і 18-у добу в периферичній крові фіксували лише еритроцити, що містили фетальний гемоглобін.

На 60-у і 120-у добу спостереження показники периферичної крові стабілізуються та не відрізняються від норми, однак характерний ще вміст фетального гемоглобіну в еритроцитах ($77,0 \pm 3,6$ %), але забарвлення клітин менш інтенсивне, чим у зразках 12-ї і 18-ї доби. У кістковому мозку спостерігається інтенсивне кровотворення і на 60-у добу кількість ядерних клітин і

ретикулоцитів таке саме, як до опромінення тварин (відмінності не вірогідні), статмокінетичний індекс вищий, ніж у нативному кістковому мозку.

Тому при дослідженні периферичної крові ми бачимо, що II група тварин вже на 18-у добу майже не відрізняється від неопромінених кроликів, а на 60-у добу кількість еритроцитів та величина гемоглобіну була вища, ніж у нормі. На 120-у добу картина периферичної крові стабілізується і вірогідно відрізняється тільки величина гемоглобіну та тромбоцитів.

У кістковому мозку на 60-у добу кількість ядерних клітин та ретикулоцитів не відрізняється від показників до опромінення, а статмокінетичний індекс вищий, що свідчить про високу проліферативну активність кісткового мозку. До 120-ї доби тварини повністю одужали від променевої хвороби.

Наявність на 12-у і 18-у добу еритроцитів із фетальним гемоглобіном (100%) є прямим доказом функціонування в крові опромінених кроликів донорських клітин, які до 120-ї доби починають “дорослішати”, переключаючись на синтез гемоглобіну дорослого типу.

При хромосомному аналізі тварин, які вижили, у жодному випадку протягом всіх спостережень не виявлено патологічних форм або мітозів.

Ці дані ще раз підкреслюють, що відновлення кровотворення проходило за рахунок клітин-донорів. Крім того, показано, що при опроміненні тварин у летальних дозах при відновленні власного кровотворення спостерігаються поліплоїдні клітини та порушення мітозу [3].

Висновки

1. Отримані результати експериментальної роботи свідчать про те, що трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин фетального походження сприяє відновленню, починаючи з 18-ї доби експерименту пригніченого променевим ураженням кровотворення та повністю змінює тяжкість перебігу променевої хвороби.

2. Вбачається перспективним та актуальним використання гемопоетичних стовбурових клітин фетального походження в комплексному лікуванні осіб із променевою хворобою та тих пацієнтів, яким у зв'язку з проведеною хіміотерапією необхідна трансплантація кісткового мозку.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи позитивні результати проведеного експериментального дослідження, доцільним є проведення клінічного випробування із залученням пацієнтів – добровольців, з метою визначення клінічної ефективності та безпечності використання гемопоетичних стовбурових клітин фетального походження як альтернативи трансплантації авто- або алогенного кісткового мозку.

Література

1. Fetal liver cell transplantation in dogs: results with DLA-compatible and incompatible grafts / R.G. Champlin, G. Gain, K.A. Stitzel [et al.] //

- Fetal Liver Transplantation. – New York: Alan R. Liss. Inc. – 1985. – P. 195-204.
2. Dzierzak E. Mouse embryonic haemopoiesis / E. Dzierzak, A. Medvinsky // Trends Genetic. – 1995. – Vol. 9. – P. 228-236
 3. Van Putten L.M. Transplantation of fetal hemopoietic cells in irradiated monkeys / L.M. van Putten, D.W. van Bekkum, M.J. de Vries // Radiation and the control of the immune response. – Vienna: International Atomic Energy Agency. – P. 41-49.
 4. Домарацкая Е.И. Эмбриональные источники дефинитивных кроветворных клеток / Е.И. Домарацкая, В.И. Старостин, Н.Н. Буторина // Известия АН. Серия биологическая. – 2001. – № 6. – С. 672-681.
 5. Активность криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека / А.И. Тарасов, Ю.К. Петренко, Д.Р.Е. Джонс [и др.] // Эксперим. онкология. – 2002. – Т. 24, № 3. – С. 24-29.
 6. Application of autologous hemopoietic cell therapy to nonhuman primate model of high-dose irradiation / J.-M. Bertho, M. Prat, J. Trick [et al.] // Radiation research. – 2005. – Vol. 163, № 5. – P. 557-570.
 7. Применение гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека в комплексном лечении больных с солидными опухолями / А.И. Смикодуб, И.В. Архипенко, В.А. Бушнев [и др.] // Трансплантология. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 273-277.
 8. Пат. 72796. Україна, МПК7 С 12 N 5/06. Спосіб отримання життєздатних ембріональних плюрипотентних клітин за допомогою колагенази / Сірман В.М., Кухарчук О.Л., Радченко В.Д.; № 20022097445; опубл. 15.04.2005, Бюл. № 4.
 9. Пат. 14589. Україна. МПК (2006) F25D 17/00 А 01 1/02. Спосіб роботи заморожувача біологічних об'єктів / Лобинцева Г.С., Гладкіх Ю.В., Лобинцев Д.В. та ін. № 200511619; Заявл. 6.12.2005; Опубл. 15.05.2006, Бюл. № 5.

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ

С.С. Паляниця

Резюме. В условиях модели экспериментальной лучевой болезни доказано, что трансплантация гемопоэтических стволовых клеток фетального происхождения способствует восстановлению ростков кроветворения у летально облученных животных, при этом существенно изменяется характер протекания лучевой болезни.

Видится перспектива использования стволовых клеток фетального происхождения для восстановления кроветворения у пациентов с аплазией костного мозга.

Ключевые слова: фетальная печень, гемопоэтические клетки, лучевая болезнь, трансплантация.

EFFECT OF CELL TRANSPLANTATION ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL RADIATION SICKNESS

S.S. Palianytsia

Abstract. Under the conditions of experimental radiation disease it is corroborated that the transplantation of hematopoietic stem cells of fetal origin contributes to the restoration blood formation in lethally irradiated animals, while dramatically changing the character of the radiation sickness. A prospect of using stem cells of fetal origin for the restoration of hematopoiesis in patients with bone marrow aplasia is foreseen.

Key words: fetal liver, hematopoietic cells, radiation sickness, transplantation.

Coordinating Center of Transplanting Organs, Tissues, and Cells of Ukraine's MHP (Kyiv)

Рецензент – д.мед.н. Д.М.Домбровский

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 1 (61). – P. 131-133

Надійшла до редакції 21.10.2011 року