

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-092

Тишевская Н.В.<sup>1</sup>, Бабаева А.Г.<sup>2</sup>, Геворкян Н.М.<sup>3</sup>

## Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензольной анемии у крыс

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Россия, 117418, г. Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», 119121, г. Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

**Цель** – оценка лечебных свойств суммарной РНК на модели хронической гипопластической анемии, выявление особенностей гемопоэтического действия суммарных РНК, выделенных из костного мозга и лимфоидных клеток селезенки.

**Методика.** Работа выполнена на 36 белых беспородных крысах-самках массой 130-250 г. Хроническую токсическую анемию моделировали подкожным введением смеси химически чистого бензола (0,05 мл/100 г) и стерильного растительного масла. Смесь вводили трижды с интервалом в 7 сут. Контрольным животным (группа 1 в каждой серии) в эти же сроки внутривенно вводили равное по объему количество 0,9% раствора NaCl. Выполнено 2 серии экспериментов. В 1-й серии оценивали гемопоэтическую активность суммарных РНК лимфоидных клеток селезенки, во 2-й — суммарных РНК костного мозга. Препараты суммарной РНК получали из костного мозга и лимфоидных клеток селезенки интактных крыс, а также из клеток тех же органов крыс, подвергнутых кровопусканию (2% от массы тела) за 17 ч до выделения из них РНК. Суммарную РНК выделяли методом гуанидин тиоцианат–фенол–хлороформной экстракции.

Для выяснения влияния суммарных РНК на состояние эритроидного роста костного мозга в препаратах, окрашенных по Паппенгейму, оценивали количественный и качественный состав эритроидных островков.

**Результаты.** Сравнение гемопоэтической активности суммарных РНК, выделенных из костного мозга и лимфоидных клеток селезенки здоровых животных, при их введении крысам с экспериментальной хронической бензольной анемией, показало, что различия клеточного состава лимфоидных органов-источников РНК отражается на их гемопоэтических свойствах. Суммарная РНК из лимфоидных клеток селезенки интактных животных в первую очередь способствует восстановлению количества лейкоцитов, в то время как суммарная РНК лимфоидных клеток костного мозга в начальный период регенерации не оказывает заметного влияния на лейкопоз. Показано также, что суммарная РНК, выделенная из костного мозга, в целом обеспечивает более интенсивный процесс гемопоэза. Кроме того, обнаружена более высокая эритропоэтическая активность суммарных РНК, выделенных из клеток обоих лимфоидных органов крыс-доноров, стимулированных кровопотерей, по сравнению с таковой суммарных РНК, полученных из органов интактных крыс.

**Заключение.** Подтверждена гемопоэтическая активность суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при гипопластической анемии. Выявлена более высокая эритропоэтическая активность суммарных РНК обоих лимфоидных органов животных после кровопускания по сравнению с их лейкопоэтической активностью.

**Ключевые слова:** гипопластическая анемия; бензол; суммарная РНК; гемопоэз; эритробластические островки.

**Для цитирования:** Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензольной анемии у крыс.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 56-64.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 56-64

**Для корреспонденции:** Геворкян Нина Михайловна, e-mail: gevorgiann@yandex.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 19.02.2018

Tishevskaya N.V.<sup>1</sup>, Babaeva A.G.<sup>2</sup>, Gevorkyan N.M.<sup>3</sup>

## Comparative analysis of hematopoietic activity of total RNA from bone marrow cells and splenocytes of rats with chronic benzene-induced anemia

<sup>1</sup>South Ural State Medical University, Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 45409, Russia;

<sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology, Tsuryupy Str. 3, Moscow 117418, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Str. 10, Moscow 119121, Russia

**Aim.** To evaluate therapeutic properties of total RNA on a model of chronic hypoplastic anemia and to elucidate features of the hemopoietic effect of total RNA isolated from bone marrow splenic lymphoid cells.

**Methods.** Experiments were performed on 36 white mongrel rats weighing 230-250 g. Chronic toxic anemia was induced by subcutaneous injections of a mixture of chemically pure benzene (0.05 ml/100 g) and sterile vegetable oil. The mixture was injected three times with an interval of 7 days. Control animals (group 1 in each series) received intravenous injections of an equal volume of saline at the same time intervals. Two experimental series were performed. In series 1 and 2, hemopoietic activity of total RNAs from splenic lymphoid cells and from bone marrow, respectively, was evaluated. Total RNA was obtained from splenic lymphoid cells and from bone marrow of intact rats and rats subjected to hemorrhage (2% of body weight) 17 h prior to the RNA isolation. Total RNA was isolated by guanidine-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. The effect of total RNA on the erythroid lineage in the bone marrow was evaluated by the quantitative and qualitative composition of erythroid islets in Pappenheim-stained preparations. **Results.** Comparing the hematopoietic activity of total RNA isolated from bone marrow and splenic lymphoid cells of healthy animals and administered to rats with experimental chronic benzene anemia showed that the difference in cell composition of the lymphoid organs, sources of the RNAs, impacted on the RNA hemopoietic properties. The total RNA from splenic lymphoid cells of intact animals contributed primarily to the recovery of leukocyte count while the RNA from the bone marrow of intact rats did not significantly influence leukopoiesis during the early regeneration period. It was also shown that the total RNA extracted from the bone marrow generally provided a more intensive hemopoiesis. In addition, the erythropoietic activity of total RNA isolated from the cells of both lymphoid organs of the donor rats stimulated by blood loss was higher than that of the total RNA isolated from intact rats.

**Conclusion.** The total RNA isolated from bone marrow and lymphoid cells spleen exerted a hemopoietic effect in hypoplastic anemia. The erythropoietic activity of total RNA from both lymphoid organs of animals after hemorrhage was higher than the RNA leukopoietic activity.

**Keywords:** hypoplastic anemia; benzene; total RNA; hemopoiesis; erythroblastic islets.

**For citation:** Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. Comparative analysis of hematopoietic activity of total RNA from bone marrow cells and splenocytes of rats with chronic benzene-induced anemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63 (2): 56-64. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 56-64

**For correspondence:** Gevorkyan N.M., e-mail: gevorkiann@yandex.ru

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 19.02.2018

Ранее при изучении особенностей развития эритроидных клеток в эритробластических островках (ЭО) костного мозга было установлено, что суммарная РНК нормальных и особенно стимулированных кровопотерей лимфоидных клеток селезенки обладает высокой эритропоэтической активностью [1–3]. Показано, что суммарные РНК костного мозга (КМ) и тимуса [4, 5] обладают выраженной гемопоэтической активностью при остром нарушении процесса кроветворения: на фоне однократного гамма-облучения в сублетальной дозе внутривенное (в/в) введение суммарных РНК КМ и тимуса у подопытных крыс вызывало быстрое и полное восстановление нормальной численности форменных элементов периферической крови. В данных пу-

бликациях продемонстрирована особенно высокая эффективность суммарных РНК, выделенных из активированных кровопотерей лимфоидных клеток, в отношении восстановления кроветворения при острых нарушениях гемопоэза. Это послужило основанием для изучения возможности использования гемостимулирующих свойств подобных препаратов РНК для коррекции хронических нарушений кроветворения, вызванных, например, бензольной интоксикацией. Лечение этих состояний, как известно, протекает медленно и далеко не всегда завершается полной нормализацией клеточного состава КМ и периферической крови [6, 7], поэтому потребность в препаратах, обладающих высокой гемопоэтической активностью, осо-

бенно высока, и поиски их до настоящего времени продолжают оставаться актуальными.

Цель — изучение лечебных свойств суммарной РНК на модели хронической гипопластической анемии и выявление особенностей гемопоэтического действия суммарных РНК, селезенки и костного мозга.

### Методика

Эксперименты выполнены в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие Приказом Ростехрегулирования от 02.12.2009 (№ 544-ст, ГОСТ Р 53434-2009). Работа одобрена локальным этическим комитетом Южно-Уральского ГМУ.

Работа выполнена на 36 белых беспородных крысах-самках массой 130—250 г. Все манипуляции с животными производили под эфирным наркозом, включая и эвтаназию, осуществляемую путем цервикальной дислокации.

Препараты суммарной РНК получали из лимфоидных клеток селезенки и из костного мозга интактных крыс (препараты РНКс-1 и РНКкм-1), а также из клеток тех же органов крыс после кровопускания (2% от массы тела) за 17 ч до выделения из них суммарных РНК (препарат РНКс-2 и РНКкм-2). Суммарную РНК выделяли методом гуанидин тиоцианат—фенол—хлороформной экстракции [8].

Для выяснения влияния препаратов суммарных РНК на состояние эритроидного ростка костного мозга в препаратах, окрашенных по Паппенгейму, оценивали количественный и качественный состав эритроидных островков (ЭО). В препаратах подсчитывали количество ЭО, разделяя их на 5 классов зрелости [9]. При оценке состояния эритропоэза показателем стимуляции развития эритроидного ростка служило статистически значимое увеличение числа ЭО1, ЭО2 и ЭОрек, а также уменьшение числа ЭОинв, тогда как снижение числа ЭО1, ЭО2 и ЭОрек наряду с увеличением количества ЭОинв, напротив, указывало на торможение процессов пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток [10, 11].

Для моделирования хронической токсической анемии всем животным трижды, с интервалом в 7 сут, подкожно вводили равную по объему смесь химически чистого бензола (0,05 мл/100 г) и стерильного растительного масла.

Тестируемые препараты суммарной РНК начинали вводить животным через 28 сут после последней инъекции бензола. Обе серии опытов выполнялись по одинаковой схеме и в одинаковых условиях. В каждой

серии животные были разделены на 3 группы, по 6 крыс в каждой: 1-я группа — контроль (бензольная анемия); 2-я — животные с бензольной анемией, получившие препарат суммарной РНК интактных животных селезенки или костного мозга (РНКс-1 или РНК-1); 3-я — животные с бензольной анемией, получившие препараты суммарных РНК от животных с кровопотерей (РНКс-2 или РНКкм-2), выделенные на стадии проявления лимфоцитами стимулирующей морфогенетической активности в отношении кроветворения (17 ч после кровопотери). Суммарную РНК вводили в/в, трижды (с интервалом в 10 сут), в дозе 15 мкг/100 г массы тела. Контрольным животным (группа 1 в каждой серии) в эти же сроки в/в вводили равное по объему количество 0,9% раствора NaCl.

Контроль численности форменных элементов периферической крови проводили каждые 10 сут. Животные первой серии были выведены из эксперимента через 110 сут после начала введения препаратов РНК, а второй — через 40 сут.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 19,0. Сравнения групп проводились методами непараметрической статистики с использованием критериев Манна-Уитни и хи-квадрат.

### Результаты и обсуждение

До начала эксперимента все крысы имели нормальные для данного вида животных показатели периферической крови: эритроциты —  $9,8 \pm 1,5$  ( $10^{12}/л$ ); ретикулоциты —  $46,7 \pm 3,2$  ( $10^9/л$ ); лейкоциты —  $11,5 \pm 1,1$  ( $10^9/л$ ); тромбоциты —  $468,6 \pm 23,2$  ( $10^9/л$ ). После введения бензола, начиная с 7-х сут снижалось число форменных элементов крови у животных. К 28-м сут количество эритроцитов составляло  $6,7 \pm 0,4$  ( $10^{12}/л$ ); ретикулоцитов —  $5,9 \pm 1,1$  ( $10^9/л$ ); лейкоцитов —  $2,6 \pm 0,4$  ( $10^9/л$ ); тромбоцитов —  $93,1 \pm 7,9$  ( $10^9/л$ ).

Динамика изменения численности этих клеток в крови контрольных и подопытных крыс (1-я серия) после введения суммарной РНКс-1 или РНКс-2 представлена в **табл. 1**.

Несмотря на значительный срок, прошедший после последней инъекции бензола, число форменных элементов крови у контрольных животных, не получавших препараты РНК, продолжало сохраняться на низком уровне и имело тенденцию к дальнейшему снижению вплоть до 70-х сут, когда появились первые признаки спонтанной коррекции гемопоэза.

У подопытных крыс первая же инъекция РНКс-2 привела к достоверному двукратному увеличению числа ретикулоцитов в крови. После второй инъекции ко-

личество ретикулоцитов возросло в 3 раза, число тромбоцитов – в 1,4 раза. После 3-й инъекции РНКс-2 число ретикулоцитов продолжало увеличиваться – этот показатель в опытной группе уже в 5 раз превышал контрольное значение. На 40-е сут после начала введения РНКс-2 стимуляция эритропоэза отразилась и на количестве эритроцитов – этот показатель статистически значимо превысил контрольное значение и

достиг нижней границы нормы, характерной для этого вида животных.

В целом восстановление числа форменных элементов крови начиналось быстрее и на большинстве сроков оказывалось более чем в 2 раза интенсивнее, чем у крыс, получавших препарат РНКс-1, и в 7 раз быстрее, чем у крыс, не получавших суммарную РНК. Через 60 сут после начала введения препарата РНКс-2 (40-е сут

Таблица 1

## Динамика показателей периферической крови у крыс с бензольной анемией после введения суммарной РНК лимфоцитов селезенки

	Срок после введения РНК	Эритроциты (x 10 <sup>12</sup> /л)	Ретикулоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)	Лейкоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)	Тромбоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)
Контроль	10 сут	6,4±0,4	6,1±0,8	2,5±0,5	94,2±6,3
РНКс-1		6,4±0,7	9,9±1,2	2,7±0,4	100,3±5,8
РНКс-2		6,5±0,5	12,4±2,3*	2,7±0,5	118,7±10,2
Контроль	20 сут	6,6±0,5	6,3±0,8	2,6±0,6	89,3±9,1
РНКс-1		6,8±0,7	8,8±0,9	8,9±0,3*	104,5±8,9
РНКс-2		7,0±0,8	18,5±1,2*■	3,0±0,5■	127,8±9,2*
Контроль	30 сут	5,9±0,7	5,9±0,6	2,8±0,6	90,9±7,5
РНКс-1		5,8±0,9	10,9±0,7*	9,3±0,7*	109,9±7,7
РНКс-2		7,2±0,5	26,1±1,4*■	3,2±0,1■	140,3±9,6*■
Контроль	40 сут	5,5±0,4	4,1±0,3	2,9±0,5	106,1±9,4
РНКс-1		6,0±0,3	11,2±0,5*	10,0±0,4*	122,4±8,1
РНКс-2		7,8±0,5*	29,2±1,1*■	3,7±0,3■	177,5±10,3*■
Контроль	50 сут	4,8±0,6	4,2±0,4	3,1±0,7	98,6±8,8
РНКс-1		6,4±0,6	15,5±0,6*	10,2±0,8*	150,8±10,1*
РНКс-2		7,8±0,5*	30,1±1,5*■	4,4±0,4■	214,4±11,2*■
Контроль	60 сут	4,7±0,3	4,2±0,5	3,1±0,5	102,8±8,7
РНКс-1		6,5±0,7	19,4±1,1*	10,1±0,6*	168,9±9,9*
РНКс-2		7,8±0,4*	32,8±1,6*■	4,9±0,5■	225,6±12,0*■
Контроль	70 сут	5,3±0,5	6,7±1,1	3,8±0,4	124,5±11,3
РНКс-1		6,9±0,8	18,5±2,3*	11,3±1,2*	170,7±10,1*
РНКс-2		7,9±0,9*	35,1±2,2*■	6,3±1,3■	219,9±9,9*■
Контроль	80 сут	5,6±0,6	7,2±0,8	4,3±0,5	139,7±15,6
РНКс-1		6,5±0,4	20,2±3,1*	10,2±0,8*	183,2±12,8*
РНКс-2		7,7±0,8*	36,6±2,7*■	8,8±1,6*	226,9±13,3*
Контроль	90 сут	6,9±0,5	12,1±1,3	6,7±0,8	188,9±12,2
РНКс-1		6,9±0,6	24,4±2,2*	10,3±1,8	214,1±18,2
РНКс-2		7,5±0,9	39,3±2,5*■	10,1±1,7	239,3±11,9*
Контроль	100 сут	6,7±0,7	19,1±1,5	6,5±0,7	194,4±13,6
РНКс-1		7,1±0,5	26,6±2,5	9,9±1,6	229,5±14,1
РНКс-2		7,4±1,2	38,8±4,7*■	10,5±1,9	248,4±14,8
Контроль	110 сут	7,0±0,5	27,4±2,8	6,6±0,9	223,7±15,5
РНКс-1		6,8±0,8	33,3±3,7	9,6±1,3	245,4±15,7
РНКс-2		7,1±1,1	38,2±3,9	10,5±1,9*	260,4±17,3

**Примечание.** \* – достоверные различия между показателями животных контрольной и опытных групп; ■ – достоверные различия между эффектами РНКс-1 и РНКс-2;  $p < 0,05$ .

после последней инъекции) количество ретикулоцитов увеличилось в 8 раз, эритроцитов – в 1,7 раза, а тромбоцитов – более чем в 2 раза. В отличие от крыс, получавших препарат РНКс-2, введение препарата РНКс-1 в первую очередь отразилось на количестве лейкоцитов в периферической крови, которое значительно увеличилось на 20-е сут после начала лечения, а к 40-м сут этот показатель превысил контрольное значение в 3 раза. К 50-м сут у животных этой группы наблюдалось отчетливое улучшение картины периферической крови по всем трем росткам кроветворения: почти в 4 раза возросло число ретикулоцитов, в 3 раза – количество лейкоцитов и в 1,5 раза – количество тромбоцитов, что дает основание говорить о стимулирующей гемопозитической активности суммарной РНК, полученной из лимфоидных клеток не только анемизированных, но и интактных животных.

К концу наблюдения все показатели, кроме уровня тромбоцитов, вошли в интервал референсных для

этого вида животных значений. При этом наилучшие результаты все же наблюдались у крыс, получивших инъекции препарата РНКс-2.

В отношении эритроидного роста кроветворения это получило подтверждение после изучения особенностей формирования ЭО в костном мозге (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о полноценном восстановлении темпа развития ЭО у крыс с бензолной анемией, получивших суммарную РНК лимфоидных клеток селезенки, стимулированных 2%-ой кровопотерей. Все три показателя активной пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток в ЭО – увеличение числа островков с пролиферирующими клетками в «короне» (ЭО1 и ЭОрек) и уменьшение количества зрелых ЭОинв – указывают на полную коррекцию экспериментально угнетенного эритропоэза у крыс, получивших РНКс-2, в отличие от группы, получившей препарат РНКс-1, и группы без воздействия препаратов.

Таблица 2

**Влияние суммарных РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз в ЭО костного мозга крыс с бензолной анемией**

Показатели	Интактные крысы	Контроль	РНКс-1	РНКс-2
Абсолютное количество ЭО (10 <sup>3</sup> /бедр. кость)	254,6±4,4	175,3±8,6□	238,2±4,5*	249,1±3,6*
% ЭО1	5,4±0,7	3,1±0,1□	4,7±0,3*	5,5±0,1*
% ЭО2	8,2±0,6	4,6±0,2□	6,5±0,2*	7,0±0,2*
% ЭО3	25,0±0,8	19,8±0,4□	22,4±0,2	23,9±0,2*
% ЭОинв	50,2±1,4	64,7±0,2□	55,1±0,5*□	51,2±0,3*■
% ЭОрек	11,2±0,7	8,3±0,1□	10,3±0,2*	13,1±0,2*■

**Примечание.** \* – статистически значимые различия между опытными и контрольной группами; ■ – статистически значимые различия между эффектами РНКс-1 и РНКс-2; □ – статистически значимые различия по отношению к показателям интактных крыс (p<0,05).

Таблица 3

**Показатели периферической крови у крыс с бензолной анемией после введения суммарной РНК костного мозга**

	Срок после введения РНК	Эритроциты (x 10 <sup>12</sup> /л)	Ретикулоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)	Лейкоциты (x 10 <sup>9</sup> /л)	Тромбоциты(x 10 <sup>9</sup> /л)
Контроль	10 сут	5,4±0,1	6,0±0,2	2,4±0,3	90,8±5,3
РНКкм-1		5,8±0,2	10,4±0,2*	2,7±0,1*	109,2±4,3*
РНКкм-2		6,1±0,2	19,1±0,3*■	4,3±0,1■*	128,5±5,8*
Контроль	20 сут	5,4±0,1	5,8±0,4	2,3±0,1	94,6±3,1
РНКкм-1		6,1±0,1*	15,3±0,2*	2,8±0,1*	115,2±4,6*
РНКкм-2		6,3±0,1*	28,5±0,3*■	5,1±0,2*■	148,7±2,4*■
Контроль	30 сут	5,2±0,1	5,9±0,1	2,5±0,3	92,4±2,8
РНКкм-1		6,7±0,2*	26,1±0,1*	5,9±0,2*	149,2±0,9*
РНКкм-2		6,9±0,3*	36,7±0,4*■	7,5±0,4*■	199,6±1,5*■
Контроль	40 сут	5,2±0,1	8,3±0,1	3,1±0,2	96,3±1,6
РНКкм-1		7,2±0,2*	22,8±0,2*	6,2±0,2*	168,7±1,1*
РНКкм-2		7,3±0,1*	39,5±0,2*■	7,9±0,3*■	212,5±1,4*■

**Примечание.** \* – статистически значимые различия между показателями животных контрольной и опытных групп; ■ – статистически значимые различия между эффектами РНКкм-1 и РНКкм-2 (p<0,05).

В задачу 2-й серии эксперимента входило выяснение вопроса, обладает ли гемопоэтической активностью (и в какой степени) РНКкм. Из представленных в таблице 3 результатов следует, что и РНКкм-1, и РНКкм-2 бесспорно обладают гемопоэтической активностью, которая в целом несколько выше, чем активность препаратов РНКс-1 и РНКс-2.

Стимулирующее действие костномозговых РНК проявлялось несколько раньше, и после их введения наблюдался более выраженный рост численности форменных элементов периферической крови. Можно предполагать, что это обусловлено наличием в костном мозге-источнике РНК ранних предшественников гемопоэза. Помимо этого, указанный эффект может быть связан также с наличием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в костном мозге – источнике РНК. Так, описано преимущественное поступление трансплантированных ММСК из периферической крови в те ткани, которые подверглись наибольшему повреждению, в частности, костный мозг после острой кровопотери [12]. Следовательно, сходным образом может вести себя и суммарная РНК из ММСК, выраженная эритропоэтическая активность которой *in vitro* была продемонстрирована нами ранее [13].

При исследовании качественного состава ЭО костного мозга крыс, получивших РНКкм-2, было установлено, что к 40-м сут пролиферативная активность эритроидных клеток полностью восстановилась, и темп формирования ЭО соответствовал физиологическому (табл. 4).

Проведенное нами исследование дает все основания утверждать, что суммарная РНК, выделенная как из костного мозга, так и из лимфоидных клеток селезенки, обладает ярко выраженными гемопоэтическими свойствами, которые обеспечивают коррекцию нарушений кроветворения, вызванных токсическим действием бензола.

В реализации регуляторных функций суммарных РНК существенную роль могут играть, в частности, малые некодирующие РНК. В последние годы многие неясные эффекты РНК приписывают действию различных микроРНК, хотя прямых данных, доказывающих такую взаимосвязь, пока нет. Отсутствие разнонаправленности действия препаратов костного мозга интактных и анемизированных животных (РНКкм-1 и РНКкм-2), которая у РНКс-1 и РНКс-2 выражалась в том, что РНКс-1 сначала стимулировала восстановление «белых» клеток в периферической крови и только потом «красных», послужило основанием для проведения электрофоретического анализа с целью определения соотношения фракций низкомолекулярных РНК в полученных нами препаратах. Оказалось, что по их процентному содержанию РНКкм-1 и РНКкм-2 гораздо меньше отличались друг от друга, чем РНКс-1 и РНКс-2. Так, если суммарная РНК лимфоидных клеток интактной селезенки содержала в 4 раза больше молекул с числом нуклеотидов менее 100, то различия между содержанием этих молекул в препаратах РНКкм-1 и РНКкм-2 составляли всего 20%. Зависит ли от этого указанная особенность действия препарата РНКс-1, пока остается неясным, хотя полученные данные свидетельствуют в пользу наличия связи между обнаруженными нами функциональными особенностями РНКс-1 и особенностями ее фракционного состава.

Первые исследования, в которых говорится об изменении экспрессии микроРНК в клетках костного мозга при бензольной интоксикации, появились совсем недавно. Установлено, что в полипотентных стволовых клетках костного мозга мышей с бензольной анемией экспрессия 50 микроРНК увеличивается, а 45 других снижается [14]. При этом значительно возрастает количество микроРНК-451, которая участвует в регуляции развития клеток эритроидного ряда [15], синтезе гемоглобина в эритроблестах [16], а также в

Таблица 4

## Влияние суммарной РНК костного мозга анемизированных крыс на эритропоэз в ЭО костного мозга крыс с бензольной анемией

Показатели	Интактные крысы	Контроль	РНКкм-2
Абсолютное количество ЭО ( $10^3$ /бедр. кость)	264,5±18,8	106,4±8,8□	228,4±16,1*
% ЭО1	4,7±0,9	0□	4,2±0,4*
% ЭО2	6,3±1,2	2,1±0,3□	5,9±1,1*
% ЭО3	25,3±3,6	15,7±2,5□	24,1±2,8*
% ЭОинв	51,1±8,3	75,6±7,2□	53,5±5,6*
% ЭОрек	12,6±1,5	6,2±0,8□	11,7±1,6*

**Примечание.** \* – статистически значимые различия между опытной и контрольной группами; □ – статистически значимые различия по отношению к показателям интактных крыс ( $p < 0,05$ ).

индукции дифференцировки самых ранних стволовых кроветворных клеток CD133<sup>+</sup> в эритроидном направлении [17].

В закономерностях развития восстановительных процессов, происходящих под влиянием суммарной РНК, имеются общие черты, выраженность которых значительно меньше зависит от того, из какого из указанных органов получен препарат, чем от функционального состояния этих органов. Суммарные РНК интактного костного мозга и лимфоидных клеток интактной селезенки по своим гемопоэтическим свойствам отличаются от таковых, выделенных из этих органов в условиях массивной кровопотери. Последние обладают большей корригирующей способностью, вызывая при этом одинаковую последовательность эффектов. Процессы восстановления гемопоэза под действием препаратов РНК из активированных кровопотерей лимфоидных органов начинаются со стимуляции эритроидного ростка, а затем распространяются на миелоидный и мегакариоцитарный. Интенсивность увеличения численности ретикулоцитов на ранних сроках наблюдения существенно выше при использовании РНК стимулированных кровопотерей клеток КМ и селезенки. Но, несмотря на то, что активность РНК<sub>км-2</sub> выше активности РНК<sub>с-2</sub>, в конечном итоге это не сказывается на результате, поскольку восстановление численности эритроцитов происходит примерно в одинаковые сроки.

Отсутствие прямой связи между интенсивностью прироста численности ретикулоцитов и увеличением числа эритроцитов в крови, по-видимому, объясняется тем, что в течение длительного времени даже после начала лечения гибель эритроцитов продолжается. Это следует из данных по изменению их числа у контрольных животных с бензолной анемией, не получавших лечебные препараты: в обеих сериях эксперимента в течение начального периода восстановления наблюдалось либо существенное снижение числа ретикулоцитов, либо постоянство их числа. Это явление может быть также следствием предполагаемого нарушения денуклеации оксифильных эритробластов, связанного с ослабленной фагоцитарной способностью макрофагов ЭО при бензолной интоксикации [18, 19].

К числу сходных черт влияния суммарной РНК на гемопоэз животных с бензолной анемией следует отнести также отсутствие полного восстановления численности всех форменных элементов периферической крови, особенно тромбоцитов — в опытных группах их количество достигает лишь половины исходного уровня. И это не связано с принципиальной неспособностью препаратов РНК стимулировать регенерацию мегакариоцитарного ростка кроветворения, так как, на-

пример, после острого лучевого воздействия исходный уровень всех форменных элементов крови под действием этих же препаратов достигается, а порой и превосходит его [4, 5].

Таким образом, в настоящей работе показано, что качественные различия клеточного состава лимфоидных органов-источников РНК сочетаются с определенными различиями их гемопоэтических свойств. Суммарная РНК лимфоидных клеток селезенки интактных животных (РНК<sub>с-1</sub>) в первую очередь способствует восстановлению количества лейкоцитов, в то время как РНК из костного мозга интактных крыс (РНК<sub>км-1</sub>) первые 20 сут не оказывает заметного влияния на лейкопоэз. Это оказалось единственным отличием гемопоэтического эффекта суммарной РНК интактных лимфоидных клеток селезенки от эффектов остальных изучаемых в данной работе препаратов РНК. Объяснить это, по-видимому, можно тем, что в норме селезенка играет особенно важную роль в обеспечении лейкогенеза. При массивной кровопотере, как и при всякой другой травме, меняется клеточность и популяционный состав лимфоидных клеток селезенки, что отражается на их функциональных свойствах и, соответственно, на свойствах их суммарной РНК. Кроме того, нами была зарегистрирована более высокая гемопоэтическая активность суммарной РНК стимулированных кровопотерей лимфоидных органов, что, по всей видимости, обусловлено таким мощным стимулом к регенерации крови, каким является 2% кровопотеря. Выявлена также более интенсивная эритропоэтическая активность РНК, выделенных из лимфоидных органов анемизированных кровопусканием животных по сравнению с их лейкопоэтической активностью, что, вероятнее всего, связано с морфогенетическими свойствами лимфоцитов [20], релализующих после кровопускания свою органоспецифическую регуляторную функцию.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 г. по теме «Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях» (НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича) и комплексной темы НИР «Регуляция кроветворной и некроветворной функций клеток костного мозга в эксперименте и клинике», № 01201354257 (Южно-Уральский государственный медицинский университет).

## Литература

1. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз *in vitro*. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 35-9.

2. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз в культуре эритробластических островков полицитемичных животных. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 40-3.
3. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Бабаева А.Г., Захаров Ю.М., Козлова Н.И., Болотов А.А. Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101(4): 451-61.
4. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Болотов А.А. Влияние предварительного введения суммарной РНК клеток костного мозга на динамику восстановления эритропоэза у крыс после острого гамма-облучения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(5): 670-3.
5. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Захаров Ю.М. Коррекция постлучевых нарушений эритропоэза суммарной РНК клеток костного мозга и тимуса. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017; 57(4): 1-7.
6. Михайлова И.В., Смолягина А.И., Красиков С.И., Караулов А.В. Влияние бензола на иммунную систему и некоторые механизмы его действия. *Иммунология*. 2014; 35(1): 51-5.
7. Захаров Ю.М., Караулов А.В., Соколов В.В., Фраш В.Н. *Изменения системы крови при воздействии радиации и бензола*. Новосибирск: Наука; 1990.
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.
9. Захаров Ю.М., Мельников И.Ю., Рассохин А.Г. Классификация эритробластических островков костного мозга с учетом изменения их клеточного состава. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1990; 5: 38-42.
10. Тишевская Н.В., Захаров Ю.М., Голуботовский Е.В., Колесников О.Л., Трофимова Н.В., Архипенко Ю.В. и др. Характер влияния фуллеренола C60(OH)24 на эритропоэз in vitro. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157(1): 57-60.
11. Тишевская Н.В., Захаров Ю.М., Архипенко Ю.В., Сазонтова Т.Г. Максимальная разовая доза препарата коллоидного серебра негативно влияет на эритропоэз in vitro. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015; 78(7): 32-5.
12. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 59(4): 82-6.
13. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Морфофункциональные особенности эритропоэза, наблюдаемые при воздействии суммарной РНК мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018; 2(26): 31-5.
14. Wei H., Zhang J., Tan K. et al. Benzene-induced aberrant miRNA expression profile in hematopoietic progenitor cells in C57BL/6 mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(11): 27058-71.
15. Dore L.C., Amigo J.D., Dos Santos C.J. et al. A GATA-1-regulated MicroRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(9): 3333-8.
16. Svasti S., Masaki S., Penglong T. et al. Expression of MicroRNA-451 in normal and thalassemic erythropoiesis. *Ann. Hematol.* 2010; 89(10): 953-8.
17. Kouhkan F., Soleimani M., Daliri M. et al. miR-451 up-regulation, induce erythroid differentiation of CD133+ cells independent of cytokine cocktails. *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2013; 16(6): 756-63.
18. Тишевская Н.В., Болотов А.А., Лебедева Я.Е. Динамика эритропоэза в эритробластических островках костного мозга при экспериментальной бензолной анемии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(3): 362-5.
19. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние гуморальных факторов на фагоцитарную активность центральных макрофагов в культуре эритробластических островков. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2002; 88(9): 1191-8.
20. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. *О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах*. Москва. «Группа МДВ»; 2016.

## References

1. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. Effect of preparations of spleen lymphoid cell total RNA on erythropoiesis in vitro. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2014; 4(12): 35-9. (In Russian)
2. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. Influence of preparations of spleen lymphoid cell total RNA on erythropoiesis in culture of erythroblast islets of polycythemic animals. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2014; 4(12): 40-3. (In Russian)
3. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Babaeva A.G., Zakharov Y.M., Kozlova N.I., Bolotov A.A. Influence of the spleen lymphoid cell total RNA on erythropoiesis in experimental polycythemia. *Rossiyskiy fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M.Sechenova*. 2015; 101(4): 451-61. (In Russian)
4. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Bolotov A.A. Effect of preliminary introduction of bone marrow cell total RNA on the dynamics of erythropoiesis restoration in rats after acute gamma-irradiation. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(5): 670-3. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zakharov Y.M. Correction of post-radiation disorders of erythropoiesis with the total RNA of bone marrow and thymus cells. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017; 57(4): 1-7. (In Russian)
6. Mihajlova I.V., Smoljagina A.I., Krasikov S.I., Karaulov A.V. Influence of benzene on the immune system and some mechanisms of its action. *Immunologiya*. 2014; 35(1): 51-5. (In Russian)
7. Zakharov Y.M., Karaulov A.V., Sokolov V.V., Frash V.N. *Changes in the blood system when exposed to radiation and benzene. [Izmeneniya sistemy krovi pri vozdeystvii radiatsii i benzola]*. Novosibirsk; Nauka. 1990. (In Russian)
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.
9. Zakharov Y.M., Mel'nikov I.Y., Rassokhin A.G. Influence of extreme factors on the homing of multipotent mesenchymal stromal cells. *Arhiv anatomii, gistologii i embriologii*. 1990; 5: 38-42. (In Russian)
10. Tishevskaya N.V., Zakharov Y.M., Golubotovskij E.V., Kolesnikov O.L., Trofimova N.V., Arhipenko Ju.V., Sazontova T.G. The nature of the effect of fullereneol C60 (OH) 24 on erythropoiesis in vitro. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2014; 157(1): 57-60. (In Russian)
11. Tishevskaya N.V., Zakharov Y.M., Arhipenko Ju.V., Sazontova T.G. The maximum single dose of silver colloidal preparation negatively affects erythropoiesis in vitro. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015; 78(7): 32-5. (In Russian)
12. Maklakova I.Ju., Grebnev D.Ju., Jastrebov A.P. Influence of extreme factors on the homing of multipotent mesenchymal stromal cells.

- Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(4): 82-6. (In Russian)
13. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. Morphofunctional features of *in vitro* erythropoiesis observed under the influence of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cell total RNA. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2018; 2(26): 31-5. (In Russian)
  14. Wei H., Zhang J., Tan K. et al. Benzene-induced aberrant miRNA expression profile in hematopoietic progenitor cells in C57BL/6 mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(11): 27058-71.
  15. Dore L.C., Amigo J.D., Dos Santos C.J. et al. A GATA-1-regulated MicroRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(9): 3333-38.
  16. Svasti S., Masaki S., Penglong T. et al. Expression of MicroRNA-451 in normal and thalassemic erythropoiesis. *Ann. Hematol.* 2010; 89(10): 953-8.
  17. Kouhkan F., Soleimani M., Daliri M. et al. miR-451 up-regulation, induce erythroid differentiation of CD133+ cells independent of cytokine cocktails. *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2013; 16(6): 756-63.
  18. Tishevskaya N.V., Bolotov A.A., Lebedeva Ja.E. Dynamics of erythropoiesis in erythroblastic islets of the bone marrow during experimental benzene anemia. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(3): 362-5. (In Russian)
  19. Tishevskaya N.V., Shevjakov S.A., Zakharov Y.M. The influence of humoral factors on the phagocytic activity of central macrophages in the culture of erythroblastic islets. *Rossiyskiy fiziologicheskij Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2002; 88(9): 1191-8. (In Russian)
  20. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. *About the morphogenetic properties of RNA of lymphoid and stem cells during regenerative processes*. Moscow: «Gruppa MDV». 2016. (In Russian)

**Сведения об авторах:**

**Бабеева А.Г.** академик РАЕН, доктор мед. наук, консультант лаб. роста и развития ФГБНУ «НИИ морфологии человека»;

**Тишевская Наталья Викторовна**, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета;

**Геворкян Нина Михайловна**, науч. лаб. биосинтеза белков НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, e-mail: gevorgiann@yandex.ru