

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092

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

## Парадоксальная рефрактерность, возникающая при аллогенном переносе животным с аллоксановым диабетом суммарной РНК лимфоцитов селезенки вылеченных особей

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Россия, 119121, Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

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

Ранее нами было показано, что препараты аллогенной суммарной РНК, выделенной из лимфоидных и стволовых клеток здоровых животных, вызывают нормализацию уровня глюкозы крови у крыс со стойким аллоксановым сахарным диабетом.

**Цель исследования** – выяснение влияния суммарной РНК лимфоцитов селезенки крыс, ранее перенесших стойкий аллоксановый диабет, на особенности течения экспериментального аллоксанового диабета у животных.

**Методика.** Эксперимент выполнен на 35 белых беспородных крысах-самках массой 250–280 г: 5 интактных животных, 20 – с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом и 10 животных, ранее перенесших стойкий аллоксановый диабет, у которых уровень глюкозы крови был полностью нормализован введением суммарных РНК клеток костного мозга, селезенки и поджелудочной железы. Диабет у этих животных моделировали однократным подкожным введением полного адьюванта Фрейнда (0,5 мл на крысу) и последующим подкожным введением аллоксана тригидрата в дозе 200 мг/кг. Достигнутая нормогликемия у животных подтверждалась в течение последующих 60 сут. Из селезенки и костного мозга этих животных методом фенол-хлороформной экстракции была выделена суммарная РНК. На 20 крысах с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом изучали эффекты однократного внутрибрюшинного введения полученной суммарной РНК (15 мкг/100 г массы тела животного).

**Результаты.** Обнаружено, что при введении суммарной РНК селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, животным с аллоксановым диабетом у последних развивалась стойкая и длительная рефрактерность к лечению терапевтическими препаратами РНК.

**Заключение.** 1. Выявлен феномен повышенной чувствительности крыс с аллоксановым диабетом к действию суммарной РНК селезенки животных, ранее перенесших аллоксановый диабет. 2. Предполагаемой причиной рефрактерности является клональный компонент суммарной РНК CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов памяти из селезенки животных, ранее перенесших аллоксановый диабет. 3. Предполагается наличие механизма адресного взаимодействия отдельных компонентов суммарной РНК селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, с их лимфоцитами-мишенями в организме реципиентов с аллоксановым диабетом.

**Ключевые слова:** рефрактерность; экспериментальный сахарный диабет; аллоксан, лимфоидные клетки; суммарная РНК; адоптивная иммунотерапия; аллогенный перенос; селезенка; костный мозг

**Для цитирования:** Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. Парадоксальная рефрактерность, возникающая при аллогенном переносе животным с аллоксановым диабетом суммарной РНК лимфоцитов селезенки вылеченных особей.

*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 37-46.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.37-46

**Участие авторов:** концепция и дизайн, выделение препаратов РНК – Геворкян Н.М.; постановка и проведение экспериментов на животных, статистическая обработка полученных данных – Тишевская Н.В.; обсуждение полученных результатов, написание текста, редактирование – Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. по теме «Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях» (НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича).

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

Поступила 03.06.2020

Принята к печати 16.10.2020.

Опубликована 26.11.2020

Gevorkyan N.M.<sup>1</sup>, Tishevskaya N.V.<sup>2</sup>, Babaeva A.G.<sup>3</sup>**Paradoxical refractoriness developing with the allogeneic transfer of splenic lymphocyte total RNA from animals with treated alloxan diabetes to animals with untreated diabetes**<sup>1</sup>V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry,  
Pogodinskaya Str. 10, Moscow, 119121, Russia;<sup>2</sup>South Ural State Medical University,  
Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk, 454092, Russia;<sup>3</sup>Research Institute of Human Morphology,  
Tsuruyupy Str. 3, Moscow, 117418, Russia

**Introduction.** Earlier we have shown that preparations of allogeneic total RNA from lymphoid and stem cells of healthy animals contribute to normalization of blood glucose levels in white outbred rats with persistent alloxan-induced diabetes mellitus.

**The aim** of this study was to find out whether allogeneic total RNA isolated from the spleen of rats treated for alloxan diabetes affects its course, as determined by changes in blood glucose, in animals with persistent alloxan diabetes.

**Methods.** Experiments were performed on 35 white outbred female rats weighing 250-280 g. Rats were divided into intact animals (n=5), rats with experimental alloxan diabetes mellitus (n=20), and rats after persistent alloxan diabetes (n=10) whose blood glucose level had been completely normalized by administering total RNA of bone marrow, splenic, and pancreatic cells (post-diabetes group). Diabetes mellitus was modeled with a single subcutaneous (s.c.) injection of complete Freund's adjuvant (0.5 ml) followed by a s.c. injection of alloxan trihydrate (200 mg/kg). Achievement of normoglycemia in animals of the post-diabetes group was confirmed over the next 60 days. Then total RNA was isolated from their spleen and bone marrow by phenol-chloroform extraction, and the effect of a single intraperitoneal injection of total RNA (15 µg/100 g body weight) was studied.

**Results.** Administration of splenic total RNA from rats previously treated for alloxan diabetes to animals with alloxan diabetes resulted in development of stable and prolonged refractoriness of diabetic rats to the treatment with therapeutic RNA preparations [11].

**Conclusions.** This study discovered a phenomenon of hypersensitivity of rats with alloxan diabetes to the diabetogenic effect of total RNA from animals that had previously had alloxan diabetes. Apparently, this refractoriness was caused by the clonal component of the total RNA of CD8<sup>+</sup> T memory lymphocytes from the spleen of post-diabetes animals. A mechanism is proposed for the interaction between individual components of splenic total RNA from post-diabetes rats and their target lymphocytes in recipients with alloxan diabetes.

**Keywords:** refractoriness; experimental diabetes mellitus; alloxan; total RNA; allogeneic transfer; lymphoid cells; spleen; bone marrow

**For citation:** Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. Paradoxical refractoriness developing with the allogeneic transfer of splenic lymphocyte total RNA from animals with treated alloxan diabetes to animals with untreated diabetes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 37-46. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.37-46

**For correspondence:** *Nina M. Gevorkyan*, Researcher, Laboratory for Protein Biosynthesis of V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya Str., Moscow 119121, Russian Federation, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

**Contribution:** Gevorkyan N.M. – research concept and design, isolation of RNA preparations; Tishevskaya N.V. – setting up and conducting experiments on animals, statistical processing of data; Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. – discussion of the data, writing text, editing.

**Acknowledgment.** This work was carried out in the framework of the Program of fundamental scientific research of state academies of sciences for 2013-2020 on the topic "Creation of cellular models of molecular processes in organs and tissues" (V.N. Orekhovich Scientific Research Institute of Biomedical Chemistry).

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

**Information about the authors:**Gevorkyan N.M., <https://orcid.org/0000-0002-0386-4010>Tishevskaya N.V., <https://orcid.org/0000-0002-4912-3111>

Received 03.06.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

**Введение**

В настоящее время можно с полным основанием утверждать, что лимфоидная ткань, помимо осуществ-

ления в организме иммунной функции, является также важнейшим регулятором процессов пролиферации и дифференцировки соматических клеток различных

гистотипов. Это свойство лимфоидных клеток, получившее название морфогенетической функции, было установлено и экспериментально обосновано А.Г. Бабаевой путем адоптивного переноса лимфоцитов селезенки оперированных животных неоперированным сингенным реципиентам [1]. В результате такого переноса в организме последних был получен морфогенетический органоспецифический ответ, и было доказано, что к регуляторной функции причастны лимфоциты именно Т-ряда [1, 2].

Морфогенетическая функция Т-лимфоцитов является неотъемлемой частью единой системы регулирования морфогенеза. Т-лимфоциты обладают многими средствами воздействия на восстановительные процессы, необходимыми для сохранения качественной сущности и анатомической целостности тканей, органов и организма в целом. Эти мобильные клетки наделены мощным рецепторным аппаратом и способны синтезировать целый ряд классических гормонов и тканевых факторов роста, обеспечивая информационный обмен между клетками не только паракринным путем, но и дистантно [3-5].

Одними из посредников в межклеточной сигнальной системе управления репаративной регенерацией являются чрезвычайно разнообразные по своим функциональным свойствам молекулы РНК, способные копировать и транспортировать информацию, регулировать экспрессию генов, катализировать образование химических связей [6].

Именно поэтому с целью выхода за рамки опытов с сингенными реципиентами и приближения возможности управления регенерационными процессами в медицине, а также в поисках адекватной субклеточной субстанции, способной реализовывать морфогенетические эффекты Т-лимфоцитов, имеющие место при их адоптивном переносе, мы остановили свой выбор на препаратах суммарной РНК, выделенных из клеток центральных и периферических лимфоидных органов [2, 7].

К настоящему времени нами доказано, что экзогенная суммарная РНК лимфоидных клеток, так же, как и сами Т-лимфоциты, обладает высоким морфогенетическим потенциалом, но при этом, в отличие от самих лимфоцитов, с ее помощью можно беспрепятственно осуществлять эффективный аллогенный и ксеногенный перенос оперативной морфогенетической информации между здоровыми особями и подопытными животными в модельных экспериментах. Так, нами установлено наличие выраженной восстановительной способности у суммарных РНК, выделенных из лимфоцитов периферической крови, селезенки, ти-

муса, суммарных РНК костного мозга, плаценты и пуповины здоровых животных в экспериментальных моделях токсической гипопластической анемии [8], аплазии костного мозга, вызванной гамма-излучением [9, 10], сахарного диабета [11], доброкачественной гиперплазии предстательной железы [12]. В моделях *in vivo* и *in vitro* была доказана регуляторная гемопозитическая активность вышеперечисленных суммарных РНК при кровопотере, экспериментальной и истинной полицитемии [13-17].

В целях дальнейшего изучения особенностей морфогенетических свойств лимфоидных клеток на уровне выделенных из них суммарных РНК, задачей настоящего исследования было выяснение возможного влияния лимфоидных клеток животных, перенесших неинфекционное заболевание, ассоциированное с ослаблением или утратой нарушенных функций, на течение этого заболевания у больных животных. Исследование проводили на крысиной модели аллоксанового сахарного диабета с целью выяснения того, влияет ли, и как именно, суммарная РНК селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, на уровень глюкозы в крови интактных животных и животных с аллоксановым диабетом. Результаты сопоставляли с данными, полученными нами ранее при устранении гипергликемии и нормализации уровня глюкозы в крови животных с аллоксановым диабетом [11], а также при изучении действия суммарной РНК селезенки крыс с аллоксановым диабетом на уровень глюкозы в крови интактных животных и животных, ранее перенесших аллоксановый диабет [18].

### Методика

Эксперименты с животными, содержащимися в стандартных условиях вивария, на стандартном рационе и при свободном доступе к воде, проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ «Принципы надлежащей лабораторной практики» от 02.12.2009. Протокол исследований одобрен Этической комиссией Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича. Работа выполнена на 35 белых нелинейных крысах-самках массой 250-280 г. 5 интактных животных, 20 – с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом и 10 животных, ранее перенесших аллоксановый сахарный диабет, у которых уровень глюкозы крови был полностью нормализован в результате введения терапевтических доз суммарных РНК (по 15 мкг/100 г массы) клеток костного мозга, селезенки и поджелудочной железы [11]. Достигнутая нормогликемия у этих животных подтверждалась в течение последующих 60 сут, после чего из селезенки и

костного мозга этих животных методом фенол-хлороформной экстракции по Хомчинскому была выделена суммарная РНК, эффекты однократного внутрибрюшинного введения которой (в дозе 15 мкг/100 г массы тела животного) изучали в данной работе.

Стойкий аллоксановый сахарный диабет моделировали предварительным однократным подкожным введением полного адьюванта Фрейнда в дозе 0,5 мл/крысу, а через 24 ч (на фоне 24-часового голодания и свободного доступа к воде) — однократным подкожным введением аллоксана тригидрата («La Chema», Чехия) в дозе 200 мг/кг (4% раствор в 0,9% NaCl). Начиная с 3-х сут после введения аллоксана, все животные получали базисную инсулинотерапию [19].

Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 19,0. Статистическую значимость различий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и Уилкоксона (различия считались статистически значимыми при вероятности ошибки 1 рода  $< 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Так же, как и при иммунном ответе, при реализации морфогенетического ответа Т-лимфоциты способны запоминать происходящие в организме морфологические и физиологические изменения, и при возникновении повторного ответа реагировать быстрее и интенсивнее [7].

Это послужило нам основанием для выяснения того, может ли суммарная РНК лимфоцитов селезенки крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, ускорить восстановление нормального уровня глюкозы в крови животных с аллоксановым диабетом, и влияет ли она на уровень глюкозы крови интактных животных.

Ранее нами было обнаружено, что однократное одновременное или последовательное — с 7-суточным интервалом — введение препаратов суммарных РНК костного мозга, поджелудочной железы и лимфоцитов селезенки (каждого в дозе 15 мкг/100 г массы тела животного) к 21-м сут приводит к стойкой нормализации уровня глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом [11]. Такой же, но ускоренный, результат уже к 17-м сут достигался при введении всего лишь 10 мкг/100 г массы тела суммарной РНК, выделенной из культуры мультипотентных мезенхимных стволовых клеток стромы пуповины человека.

Помимо перечисленных суммарных РНК, в настоящей работе был использован также препарат суммарной РНК плаценты — ткани, особо обогащенной ство-

ловыми клетками [20]. Ранее нами было выявлено выраженное стимулирующее эритропоэз воздействие крысиной плацентарной суммарной РНК в культуре эритробластических островков костного мозга крыс [17].

В данном исследовании у крыс-доноров селезенки и костного мозга, через 21 сут после введения им аллоксана, уровень глюкозы крови составлял в среднем  $21,98 \pm 0,45$  ммоль/л, а через 60 сут после полной нормализации уровня глюкозы крови под действием соответствующих препаратов суммарной РНК, когда крыс выводили из эксперимента, —  $5,20 \pm 0,11$  ммоль/л.

Внутрибрюшинное введение интактным крысам по 15 мкг/100 г суммарной РНК, выделенной из лимфоцитов селезенки животных, вылеченных от аллоксанового диабета (РНКсвд) не сказалось на их нормогликемическом статусе. При ежедневном измерении уровень глюкозы в крови этих животных на протяжении 5 сут колебался в интервале 4,7–5,6 ммоль/л.

В отличие от этого результата и вопреки ожидаемому, введение РНКсвд животным с аллоксановым диабетом не только не ускоряло нормализацию уровня глюкозы крови, но и активно препятствовало его снижению, тогда как в отсутствие РНКсвд препарат суммарной РНК из селезенки нормальных животных в кратчайшие сроки приводил к существенному уменьшению гипергликемии [11]. В **таблице 1** приведены результаты исследования влияния суммарной РНКсвд на динамику уровня глюкозы крови у крыс с аллоксановым диабетом (группа 1). Этой группе животных по прошествии 28 сут после однократного введения 15 мкг РНК селезенки «вылеченных диабетиков» ввели по 45 мкг суммарной РНК крысиной плаценты, а ещё через 28 сут — по 15 мкг суммарной РНК пуповины человека. Группа 2 представляла собой группу животных также с аллоксановым диабетом, которым сначала однократно ввели по 45 мкг суммарной РНК крысиной плаценты, а через 28 сут — еще по 15 мкг суммарной РНК пуповины человека. Таким образом, в **таблице 1** — для удобства сравнения — представлены результаты изменения динамики уровня глюкозы крови в двух группах животных с аллоксановым диабетом, с той лишь разницей, что в группе 1 лечение с помощью препаратов РНК плаценты и пуповины осуществляется на фоне предварительно введенной суммарной РНКсвд.

Из **таблицы 1** видно, что введение суммарной РНКсвд крысам с аллоксановым диабетом на первых порах не только не способствует нормализации, но даже вызывает дополнительное повышение уровня глюкозы крови, который возвращается к исходным пока-

зателям лишь к 7-м сут после введения. Это неожиданный результат. Согласно нашим данным [11], именно в те же сроки, то есть в течение первых 7 сут, достигается максимальный эффект статистически значимого снижения уровня глюкозы крови у крыс с аллоксановым диабетом, обеспечиваемый однократным введением суммарной РНК лимфоцитов селезенки интактных животных в указанной дозе. В отличие от этого,

под действием РНКсвд эффект снижения достигается лишь к 28-м сут, начинаясь не сразу, а только через неделю после воздействия (в течение которой гипергликемия возрастает), и достигает своего предела на 2–3 нед позже.

Усиление гипергликемии в течение первой недели после введения РНКсвд крысам с аллоксановым диабетом тем более интересно, что введение этого пре-

Таблица 1

**Влияние РНК селезенки вылеченных от диабета животных (РНКсвд), плаценты и пуповины на динамику уровня глюкозы в крови у крыс с аллоксановым диабетом**

Показатели	Группа 1 РНКсвд (15 мкг)	Группа 2
Исходный уровень глюкозы крови (ммоль/л)	20,2±0,6	20,3±0,6
Сутки эксперимента (в скобках – сутки после введения очередного препарата)		
3 сут	22,8±0,6	
5 сут	21,5±0,9	
7 сут	20,7±0,5	
10 сут	18,6±0,3	
14 сут	18,9±0,5	
17 сут	18,5±1,1	
21 сут	18,2±0,6	
28 сут	17,5±0,9	(20,3±0,6)
	<b>+ РНКплаценты (45 мкг)</b>	<b>РНКплаценты (45 мкг)</b>
31 (3) сут	17,1±0,5	18,7±0,5
33 (5) сут	-	-
35 (7) сут	17,9±0,5	16,0±0,6
38 (10) сут	16,8±0,4■	13,9±0,5
42 (14) сут	17,0±0,5■	13,1±0,6
45 (17) сут	17,0±0,5 ■	11,6±0,5
49 (21) сут	-	-
56 (28) сут	17,4±0,4 ■	11,5±0,6
	<b>+ РНКпуповины (15 мкг)</b>	<b>+ РНКпуповины (15 мкг)</b>
59 (3) сут	15,3±0,4 ■	10,3±0,6
61 (5) сут	13,6±0,6 ■	8,7±0,4
63 (7) сут	12,7±0,3 ■	8,4±0,6
66 (10) сут	10,9±0,7 ■	8,1±0,4
70 (14) сут	11,2±0,6 ■	8,3±0,3
73 (17) сут	9,4±0,6 ■	7,6±0,3
77 (21) сут	9,5±0,4 ■	7,8±0,5
84 (28) сут	8,5±0,6 ■	6,8±0,4

**Примечание.** В скобках после названия препарата РНК – его доза в мкг/100 г массы «■» – статистическая значимость различий между группами 1 и 2.

парата интактным животным гипергликемии у них не вызывало. По всей вероятности, речь здесь может идти об адресном взаимодействии отдельных компонентов суммарной РНКсвд (которая получена из всей совокупности клонов лимфоцитов селезенки донора) с их лимфоцитами-мишенями в организме реципиента, поскольку полученный результат позволяет думать о реакции, которую вызывает РНК донорских лимфоцитов памяти на аллоксановую ситуацию в организме реципиента (как если бы встреча лимфоцитов донора с аллоксаном произошла повторно!).

В подтверждение такого вывода можно привести симметричный эффект, обнаруженный нами ранее [18]: введение суммарной РНК селезенки крыс с аллоксановым диабетом (РНКсад) животным, ранее перенесшим аллоксановый диабет, вызывало у последних гипергликемию, статистически значимо более выраженную, чем у интактных животных (табл. 2).

Здесь ситуация зеркальная, и результат опять же напоминает картину вторичного ответа, но теперь это ответ лимфоцитов памяти в организме животного, уже перенесшего аллоксановый диабет, на суммарную РНК лимфоцитов селезенки больного аллоксановым диабетом донора.

Таблица 2

**Влияние суммарной РНК крыс с аллоксановым диабетом (РНКсад) на уровень глюкозы в крови у интактных и ранее перенесших аллоксановый диабет животных**

	Интактные крысы (n=6)	Крысы, ранее перенесшие аллоксановый диабет (n=6)
	РНКсад (15 мкг/100г)	РНКсад (15 мкг/100г)
Исходный уровень глюкозы крови (ммоль/л)	5,7±0,1	5,4±0,2
Сутки после введения препарата		
3 сут	8,0±0,5	11,6±0,6■
5 сут	14,3±0,6	18,6±0,3■
7 сут	17,8±0,3	19,1±0,4
10 сут	16,7±0,5	19,3±0,5■
14 сут	15,7±0,4	19,9±0,3■
17 сут	13,2±0,5	17,5±0,2■
21 сут	9,2±0,3	15,3±0,5■
28 сут	6,1±0,3	11,6±0,5■

**Примечание.** ■ – статистически значимые различия между группами.

В этой связи нельзя мимоходом не отметить то, до чего наглядно описанные реакции демонстрируют приспособительный характер гипергликемического ответа организма на аллоксан!

Наконец, третий эффект, который обращает на себя внимание, – это полная резистентность (в отношении уровня гипергликемии) животных с аллоксановым диабетом к терапевтическому действию суммарной РНК плаценты на протяжении последующих 28 дней после введения им РНКсвд (29–56 сут эксперимента, табл. 1)! И это – несмотря на известную обогащенность плаценты стволовыми клетками [20] и доказанную нами эффективность действия РНК плаценты (также как и РНК стволовых клеток) в опытах по стимуляции морфогенетических процессов [7, 16, 17].

Приспособительные реакции, развивающиеся на клеточном, органном и системном уровнях, связанные с морфологической и функциональной перестройкой многих органов и тканей, и формирование адаптивного ответа в конечном итоге зависят от направленности регуляторных процессов в системе иммуногенеза [1, 2, 7, 21–23], то есть от функционального состояния лимфоидных клеток на той или иной стадии регенерационного процесса.

Преимущественная органная и фазовая специфичность морфогенетической активности лимфоцитов, наблюдаемая в процессе регенерации, свидетельствует о наличии в иммунной системе разных клонов лимфоцитов, находящихся в особых отношениях с их тканями-мишенями. С этим связана возможность избирательного поражения отдельного клона (клонов) лимфоцитов с соответствующими нарушениями функции контролируемой им ткани-мишени. То есть морфогенетическая, так же как и иммунологическая, толерантность может представлять собой специфическое подавление морфогенетического ответа на уровне отдельных клонов лимфоцитов.

«Имунологическая толерантность представляет собой одну из форм активности иммунной системы. Классическая трактовка природы иммунологической толерантности состоит в том, что введенный антиген вызывает элиминацию или анергию клонов лимфоцитов, которые его распознают» [24]. То же относится и к морфогенетической функции лимфоцитов – период толерантности, или резистентности, как правило, сопровождается любой восстановительный процесс, который на заключительном этапе ассоциирован с супрессорной фазой активности лимфоцитов. При этом начало периода супрессии зависит от органа, в котором происходит процесс регенерации, от характера и степени повреждения, а также от вида и возраста животного, тогда как

время окончания этого периода чаще всего неизвестно, поскольку изучение этого вопроса могло быть сопряжено только со специальной задачей. Можно лишь предполагать, что длительность супрессорного периода тоже в большой мере зависит от указанных факторов. Известно, например, что при резекции селезенки наблюдается быстрая и длительная реакция Т-супрессоров, выявляемая как в смешанной культуре спленоцитов, так и по способности этих клеток подавлять проявления регионарной реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Наиболее длительные сроки супрессии, определяемые по нормализации уровня пролиферативной активности спленоцитов, были ассоциированы с адреналэктомией (не более 21 сут) и термическим ожогом кожи с повреждением 30% поверхности тела (не более 25 сут) [25]. В нашем случае сроки рефрактерности к лечению, вызванной введением суммарной РНК спленоцитов крыс, перенесших аллоксановый диабет, значительно превосходили указанные, составляя 60 сут после полной нормализации глюкозы крови у доноров плюс 28 сут чрезвычайно замедленного процесса снижения глюкозы крови у реципиентов с аллоксановым диабетом под действием РНКсвд, плюс еще 28 сут абсолютной рефрактерности к действию РНК плаценты, и плюс еще 28 сут очень замедленного процесса восстановления в ответ на РНК пуповины (табл. 1)! Однако в контексте данного исследования, помимо столь длительного срока супрессии, интересны также сам факт и причина такого мощного сопротивления процессу восстановления нормального уровня глюкозы крови у животных с гипергликемией под действием РНК спленоцитов крыс, перенесших аллоксановый диабет.

Результаты данной серии экспериментов свидетельствуют о том, что наблюдаемая нами рефрактерность к лечению аллоксанового диабета эффективными препаратами суммарных РНК, полученных от интактных доноров, обусловлена именно лимфоцитами животных, перенесших это заболевание. Этот вывод обусловлен следующими соображениями. РНК костного мозга переболевших животных (РНК КМвд) в меньшей степени, но тоже вызвала существенное торможение процесса нормализации уровней глюкозы крови у больных реципиентов (данные не представлены). При этом, несмотря на торможение, терапевтический эффект был статистически значимо выше в группе животных, которым вводили по 15 мкг, чем у тех, которым вводили по 5 мкг РНК КМвд/100 г массы тела. Являясь центральным органом лимфопоэза, костный мозг содержит достаточное количество лимфоцитов. Однако морфогенетический эффект стволовых клеток в нем, по-видимому, превалирует, поэто-

му с увеличением объема вводимой РНК клеток костного мозга эффект нормализации уровня глюкозы крови преобладает над процессом торможения. Вообще создается впечатление, что не количество введенной РНКсвд, а сама природа лимфоцитов переболевших животных, то есть сам факт их наличия, является определяющим в развитии тормозящего эффекта. Это подтверждается и тем, что 5 мкг/100 г массы тела введенной РНКсвд (данные не приведены) и 15 мкг/100 г (см. табл. 1) практически в одинаково высокой степени и с одинаковой динамикой тормозят процесс нормализации гликемического статуса крыс, тогда как под действием РНК селезенки интактных животных нормализация происходит быстро и эффективно [11].

В отличие от эффекта РНК селезенки интактных животных, под действием 15 мкг/100 г которой уровень глюкозы крови крыс с аллоксановым диабетом за 7 сут снижается приблизительно на 30-35%, РНКсвд в том же количестве за 28 сут способна улучшить гликемический статус крыс всего лишь на 13-14%. То есть налицо выраженная супрессия, на фоне которой едва пробивается почти вчетверо сниженный терапевтический эффект РНКсвд. По всей видимости, речь здесь может идти не только о супрессии, но и о клональном снижении морфогенетического потенциала лимфоцитов селезенки переболевших животных.

Последующие 28 сут в группе больных животных наблюдается удивительное постоянство уровня глюкозы крови, несмотря на воздействие достаточно эффективной в норме суммарной РНК из пренатальной плаценты крыс. И только начиная с 56-х сут эксперимента, после введения животным суммарной РНК из постнатальной пуповины человека, начинается (тоже весьма замедленное) снижение содержания глюкозы в крови животных.

Возвращаясь к вопросу о механизмах повышения глюкозы крови в ответ на введение РНКсвд и РНКсад, напоминающего картину вторичного ответа, в дополнение к предполагаемому участию лимфоцитов памяти в этом процессе, можно привести данные, полученные китайскими исследователями при изучении роли Т-лимфоцитов и их субпопуляций в индукции аутоиммунного диабета у мышей BALB/c [26]. Развитие сахарного диабета у сингенных реципиентов вызывали адоптивным переносом  $3 \times 10^6$  диабетогенных Т-лимфоцитов, полученных из селезенок мышей-доноров после пятикратных внутрибрюшинных инъекций стрептозотоцина из расчета 40 мг/кг массы тела и последующего 7-суточного культивирования их Т-клеток в присутствии интерлейкина-2. Было показано, что отдельно взятая фракция CD4<sup>+</sup> из популяции диабетогенных

T-лимфоцитов не способна была вызвать сахарный диабет у реципиентов. Это может служить основанием для предположения, что и в нашем случае источником вызывающей рефрактерность РНКсвд является популяция CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов памяти.

В этой связи, можно объяснить еще одно явление, вызывающее вопросы. Так, было обнаружено [27], что при адоптивном переносе сингенным реципиентам разных количеств (от 10<sup>3</sup> до 10<sup>7</sup>) T-лимфоцитов селезенки мышей BALB/c с стрептозотоциновым диабетом, наиболее выраженную гипергликемию вызывало наименьшее количество перенесенных клеток! Это тоже объяснимо. Как следует из результатов наших экспериментов (см. выше), для осуществления переноса важно лишь небольшое (пороговое) количество введенных клеток, дальнейшее повышение количества которых не отменяет факт переноса патологического состояния, но может содержать все больше супрессорных клеток, которые, по-видимому, играют еще и сдерживающую роль в развитии патологического процесса в организме донора. Далее, в этой же публикации [27] был описан эффект максимальной экспрессии гипергликемии у мышей-реципиентов при адоптивном переносе сингенных T-лимфоцитов мышей со стрептозотоциновым диабетом, предварительно подвергнутых гамма-облучению в низкой дозе (200 Рентген). Учитывая тот факт, что CD8<sup>+</sup> T-лимфоциты более чувствительны к гамма-облучению, а также на основании вышеизложенного, можно прийти к заключению, что результатом такого воздействия явилось повреждение части CD8<sup>+</sup> T-супрессоров, приблизившее количество оставшихся CD8<sup>+</sup> T-клеток к пороговому, то есть к их количеству, необходимому и достаточному для воспроизведения максимального гипергликемического статуса у реципиентов.

Полученные результаты не дают ответа на вопрос, почему РНК плаценты не вызвала никакого действия, тогда как под действием РНК пуповины продолжился процесс снижения уровня глюкозы крови. Не известно пока, связано ли это с большей эффективностью терапевтического действия РНК пуповины, чем плаценты, или же введение этого препарата совпало с окончанием фазы рефрактерности, вызванной гомеостатическим эффектом суммарной РНК селезенки перенесших диабет животных. Для выяснения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования, которые могут иметь определенное значение для терапии таких состояний.

В этой связи можно предположить, что известная клиницистам рефрактерность к лекарственной терапии, наблюдаемая у некоторой части больных, тоже в

определенных случаях может быть не конститутивным свойством, а временным явлением. Это состояние может возникнуть, например, из-за того, что организму удалось еще до манифестации болезни — бессимптомно или в стертой форме — преодолеть ее клинические проявления. В таком случае рефрактерность может объясняться клональным гомеостатическим эффектом лимфоцитов больного и носить временный характер.

В этой же связи, в качестве одной из предполагаемых причин того, что хронические заболевания труднее, чем острые, подлежат коррекции, может выступать рефрактерность, связанная с тенденцией поддержания CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитами памяти гомеостаза, достигнутого в результате сложного ряда адаптивных перестроек.

### Литература

1. Бабаева А.Г. *Регенерация и система иммуногенеза*. М.: Медицина. 1985.
2. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. *Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей*. М.: Изд-во РАМН. 2009.
3. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль T-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(2): 189–202.
4. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. T-лимфоциты и тканевые факторы роста. *Рос. физиол. журн. им. Сеченова*. 2015; 101(8): 865–84.
5. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Современный взгляд на роль T-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. *Успехи современной биологии*. 2016; 136(1): 83–96.
6. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Рос. физиол. журн. им. Сеченова*. 2016; 102(11): 1280–301
7. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. *О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах*. М.: «Группа МДВ». 2016.
8. Тишевская Н. В., Бабаева А. Г., Геворкян Н. М. Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензолной анемии у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 56–64.
9. 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): 384–90.
10. 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.
11. Геворкян Н. М., Тишевская Н. В., Бабаева А. Г. Роль суммарных РНК лимфоидных и стволовых клеток в коррекции уровня глюкозы в крови при экспериментальном сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3): 88–95.

## References

12. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Головнева Е.С., Максаков Д.А. Регресс экспериментальной гиперплазии предстательной железы под действием лимфоцитарных и органных РНК. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018; 1(25): 61-6.
13. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О стимулирующих эритропоэз свойствах суммарной РНК лимфоцитов периферической крови при эритроемии. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2015; 1(13): 33-7.
14. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология*. 2015; 10(2): 58-62.
15. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки крыс на эритропоэз в культуре эритробластических островков крыс с полицитемией. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 40-3.
16. 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.
17. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. Эритропоэтическая активность суммарной РНК клеток плаценты in vitro. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2016; 4(20): 31-5.
18. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. О феномене повышенной чувствительности крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, к диабетогенному воздействию суммарной РНК. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(2): 92-5.
19. Волчегорский И.А., Тишевская Н.В., Дементьева Е.В. Антианемическое действие реамберина в остром периоде аллоксанового диабета у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008; 71(6): 23-7.
20. Сериков В.Б., Куйперс Ф. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2008; 2: 51-6.
21. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Влияние морфогенетической активности лимфоцитов на реактивность и резистентность организма. *Онтогенез*. 2018; 49(1): 54-66.
22. Бабаева А. Г., Геворкян Н. М., Тишевская Н. В. Адаптивная изменчивость суммарной РНК лимфоидных клеток как причина невоспроизводимости вызываемых ею эффектов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(1): 91-8.
23. Бабаева А. Г., Геворкян Н. М., Тишевская Н. В. *Очерки об особенностях изучения эффектов РНК и об РНК-терапии*. М.: 2019.
24. Ярилин А.А. *Иммунология*. М.: Гэотар-Медиа. 2010.
25. Бабаева А.Г., Зотиков Е.А. *Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений*. М.: Наука. 1987.
26. Zou X.L., Zhao Z.Y., Wang Y.Y., Su Z.Q., Xiang M. Diabetogenic T cells induce autoimmune diabetes in BALB/c mice. *Chin Med Sci J*. 2008; 23(2): 88-94.
27. Buschard K., Rygaard J. T-lymphocytes transfer streptozotocin induced diabetes mellitus in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. C*. 1978; 86(6): 277-82.
1. Babaeva A.G. *Regeneration and the system of immunogenesis. [Regeneratsiya i sistema immunogeneza]*. Moscow: Meditsina. 1985.
2. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov E.A. *The role of lymphocytes in the operative change in the program of tissue development. [Rol' limfotsitov v operativnom izmenenii programmy razvitiya tkaney]*. Moscow: RAMS. 2009. (In Russian)
3. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(2): 189-202. (In Russian)
4. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. T-lymphocytes and tissue growth factors. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. Sechenova*. 2015; 101(8): 865-84. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2016; 136(1): 83-96. (In Russian)
6. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The role of lymphocytic RNA in the intercellular information exchange and in the regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. Sechenova*. 2016; 102(11): 1280-301. (In Russian)
7. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. *About the morphogenetic properties of RNA of lymphoid and stem cells during regenerative processes. [O morfogeneticheskikh svoystvakh RNK limfoidnykh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nykh protsessakh]*. Moscow: «Gruppa MDV». 2016. (In Russian)
8. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. Comparative Analysis of Hematopoietic Activity of Bone Marrow and Splenocyte Total RNA in Chronic Benzene Anemia in Rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(2): 56-64. (In Russian)
9. 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): 384-90. (In Russian)
10. 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. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(5): 670-3. (In Russian)
11. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. The role of lymphoid and stem cell total RNAs in correction of blood glucose levels in experimental diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(3): 88-95. (In Russian)
12. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Golovneva E.S., Maksakov D.A. Regression of experimental prostatic hyperplasia under the influence of lymphocytic and organ RNA. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2018; 1(25): 61-6. (In Russian)
13. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Ju.O., Ragimov A.A. About erythropoiesis-stimulating properties of peripheral blood lymphocyte total RNA in erythremia. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2015; 1(13): 33-7. (In Russian)
14. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Yu.O., Ragimov A.A. On the hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes in patients with true polycythemia and healthy donors. *Oncogematologiya*. 2015; 10(2): 58-62. (In Russian)
15. 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)
16. 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)
  17. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. In vitro erythropoietic activity of total RNA of placental cells. *Klinicheskaya i eksperimental'naya Morfologiya*. 2016; 4(20): 31-5. (In Russian)
  18. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. On the phenomenon of hypersensitivity of rats that previously underwent alloxan diabetes to the diabetogenic effect of total RNA. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2020; 64(2): 92-5. (In Russian)
  19. Volchegorskii I.A., Tishevskaya N.V., Dement'eva E.V. Antianemic effect of reamberin in rats with acute alloxan-induced diabetes. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2008; 71(6): 23-7. (In Russian)
  20. Serikov V., Kuypers F. Human placenta as a source of hematopoietic stem cells. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2008; (2): 51-6. (In Russian)
  21. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The effect of morphogenetic activity of lymphocytes on the reactivity and resistance of the body. *Ontogenez*. 2018; 49(1): 54-66. (In Russian)
  22. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. Adaptive variability of total RNA in lymphoid cells as a cause for non-reproducibility of its effects. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(1): 91-8. (In Russian)
  23. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. *Essays on features of study effects of RNA and RNA-therapy. [Ocherki ob osobennostyakh izucheniya ehffektov RNK i ob RNK-terapii]*. Moscow. 2019. (In Russian)
  24. Yarilin A.A. *Immunology*. Textbook. [*Immunologiya*. Uchebnyk]. Moscow. GEOTAR-Media. 2010. (In Russian)
  25. Babaeva A.G., Zotikov E.A. *Immunology of the processes of adaptive growth, proliferation and their disorders. [Immunologiya protsessov adaptivnogo rosta, proliferatsii i ikh narusheniy]*. Moscow. Nauka. 1987. (In Russian)
  26. Zou X.L., Zhao Z.Y., Wang Y.Y., Su Z.Q., Xiang M. Diabetogenic T cells induce autoimmune diabetes in BALB/c mice. *Chin Med Sci J*. 2008; 23(2): 88-94.
  27. Buschard K., Rygaard J. T-lymphocytes transfer streptozotocin induced diabetes mellitus in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1978; 86(6): 277-82.

**Сведения об авторах:**

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

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

**Бабеева Анна Георгиевна**, доктор мед. наук, акад. РАЕН, консультант лаб. роста и развития ФГБНУ «НИИ морфологии человека».