

© Коллектив авторов, 2021

УДК 577.214.5 + 616.155.321

Тишевская Н.В.¹, Геворкян Н.М.², Позина А.А.¹

Лиофилизированная форма ксеногенной суммарной РНК стимулирует гемопоэз при постлучевой миелосупрессии

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

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, Москва, Россия, ул. Погодинская, 10, стр. 8

Введение. Аллогенная суммарная РНК, выделенная из клеток лимфоидных органов, стимулирует регенерацию кроветворной ткани после острого и хронического нарушения кроветворной функции. **Цель исследования:** 1) доказательство отсутствия ксеногенных ограничений механизмов лимфоцитарного контроля регенеративных процессов на примере гемостимулирующего действия суммарной РНК лимфоцитов бычьей селезенки в отношении кроветворения крыс, подвергшихся гамма-облучению в сублетальной дозе; 2) сравнительный анализ эффективности нативной и лиофилизированной форм указанной РНК.

Методика. Работа выполнена на белых нелинейных крысах-самцах массой 200-220 г. Суммарную РНК выделяли методом фенол – хлороформной экстракции из лимфоидных клеток бычьей селезенки. Для создания исходной миелосупрессии 30 крыс подвергли однократному общему воздействию гамма-излучения с источником ⁶⁰Co в дозе 6 Гр при мощности дозы 0,1 Гр/с, после чего разделили их на 3 равные группы. Через 2 ч после облучения крысам контрольной группы внутривенно ввели по 0,5 мл 0,9% NaCl; крысам 2-й группы – нативную суммарную РНК в дозе 30 мкг/100г массы, крысам 3-й группы – лиофилизированную суммарную РНК в аналогичной дозе. На 3-и, 7-е и 12-е сут в периферической крови определяли количество ретикулоцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, после чего крысы были выведены из эксперимента с целью исследования костномозгового кроветворения. Через 12 сут в костном мозге определяли количество эритроидных, лимфоидных, мегакариоцитарных и миелоидных клеток. Из костного мозга выделяли эритробластические островки (ЭО) и дифференцировали их на пролиферирующие (ЭО 1,2 классов и реконструирующиеся ЭО) и зрелые (ЭО 3 класса и инволюционирующие ЭО) морфо-функциональные клеточные ассоциации.

Результаты. Под влиянием ксеногенной суммарной РНК в периферической крови крыс в 2-3 раза увеличилось количество лейкоцитов и в 1,6-1,75 раза возросло число ретикулоцитов. В костном мозге увеличилось количество пролиферирующих миелоидных и лимфоидных элементов, а также общее число клеток эритроидного ряда. Ксеногенная суммарная РНК стимулировала образование ЭО как на основе контакта свободных костномозговых макрофагов с молодыми эритроидными клетками (ЭО 1 и 2 классов), так и на базе реконструкции (ЭО реконструирующиеся). Сравнительный анализ эффектов нативной и лиофилизированной суммарной РНК не выявил различий между гемопоэтическими показателями у крыс, получивших эти препаратов.

Заключение. Суммарная РНК, выделенная из лимфоидных клеток бычьей селезенки, активирует гемопоэз у крыс с постлучевой миелосупрессией, что свидетельствует об отсутствии ксеногенных ограничений у млекопитающих в механизмах лимфоцитарного контроля восстановительных процессов. Лيوфилизированная суммарная РНК активирует костномозговое кроветворение в те же сроки и в том же объеме, что и нативная форма.

Ключевые слова: суммарная РНК; лимфоциты; гемопоэз; регенерация; гамма-облучение

Для цитирования: Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Позина А.А. Лиофилизированная форма ксеногенной суммарной РНК стимулирует гемопоэз при постлучевой миелосупрессии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 42-46.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.42-46

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

Участие авторов: дизайн исследования и выделение препаратов РНК – Геворкян Н.М.; проведение экспериментов на животных и статистическая обработка полученных данных – Тишевская Н.В., Позина А.А.; обсуждение полученных данных, написание текста, редактирование – Тишевская Н.В., Геворкян Н.М.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.01.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Tishevskaya N.V.¹, Gevorkyan N.M.², Pozina A.A.¹

A lyophilized form of xenogeneic total RNA stimulates hematopoiesis in post-radiation myelosuppression

¹South Ural State Medical University,
Russia, Vorovskogo St. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation;

²V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry,
Pogodinskaya St., 10, Moscow 119121, Russian Federation

Introduction. Allogeneic total RNA isolated from cells of lymphoid organs stimulates regeneration of hematopoietic tissue after acute and chronic disturbance of hematopoietic function. **Aim.** 1) To prove the absence of xenogeneic limitation for the lymphocytic regulation of regenerative processes using an example of the hemo-stimulating effect of total RNA from bovine spleen lymphocytes on hematopoiesis in rats exposed to sublethal gamma-irradiation; 2) To perform a comparative analysis of the effectiveness of the native and lyophilized forms of the total RNA.

Methods. Experiments were performed on white outbred male rats weighing 200-220 g. Total RNA was isolated from bovine spleen lymphoid cells by phenol-chloroform extraction. To create the initial myelosuppression, 30 rats were exposed to a single general ⁶⁰Co gamma radiation (6 Gy at 0.1 Gy/s). The rats were then divided into 3 equal groups. Two hrs after irradiation, the rats of the control group were injected intraperitoneally with 0.5 ml of 0.9% NaCl; rats of the second group received native total RNA, 30 µg/100 g body weight, and rats of the third group received lyophilized total RNA at a similar dose. On days 3, 7, and 12, the number of peripheral blood reticulocytes, leukocytes, and platelets was measured. The rats were then sacrificed, and bone marrow hematopoiesis was studied. After 12 days, the number of bone marrow erythroid, lymphoid, megakaryocytic, and myeloid cells was measured. Erythroblastic islets (EIs) were isolated from the bone marrow and differentiated into proliferating (class 1 and 2 EIs and reconstructing EIs) and mature (class 3 EIs and involving EIs) morpho-functional cell associations.

Results. Under the influence of xenogeneic total RNA, the number of peripheral blood leukocytes increased by 2-3 times, and the number of reticulocytes increased by 1.6-1.75 times. In the bone marrow, the number of proliferating myeloid and lymphoid cells increased, as did the total number of erythroid cells. Xenogeneic total RNA stimulated formation of EIs, based both on the contact of free bone marrow macrophages with young erythroid cells (class 1 and 2 EIs) and on reconstruction (reconstructing EIs). Comparative analysis of the effects of native and lyophilized total RNA did not reveal differences between hematopoietic parameters in rats that received these agents.

Conclusion. Total RNA isolated from bovine spleen lymphoid cells activates hematopoiesis in rats with post-radiation myelosuppression. This indicates the absence of mammalian xenogenic limitation of lymphocytic control of recovery processes. Lyophilized total RNA activates bone marrow hematopoiesis at the same rate and to the same extent as the native form.

Keywords: total RNA; lymphocytes; hematopoiesis; regeneration; gamma irradiation

For citation: Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Pozina A.A. A lyophilized form of xenogeneic total RNA stimulates hematopoiesis in post-radiation myelosuppression. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): 42-46. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.42-46

For correspondence: *Nina M. Gevorkyan*, Researcher, Laboratory for Protein Biosynthesis of «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Biomedical Chemistry», e-mail: gevorkiann@yandex.ru

Contribution: Study design and isolation of RNA preparations – Gevorkyan N.M.; conducting experiments on animals and statistical processing of the data obtained – Tishevskaya N.V., Pozina A.A.; discussion of the received data, writing text, editing – Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M.

Financing. The work was carried out in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030.

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 09.01.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

Введение

Ранее нами было показано, что аллогенная суммарная РНК, выделенная из клеток лимфоидных органов, стимулирует регенерацию кроветворной ткани после острого повреждения у облученных животных [1] и при

хроническом угнетении кроветворения [2]. При изучении ксеногенных эффектов было установлено, что РНК лимфоцитов человека активирует все ростки кроветворения у крыс с токсической апластической анемией [3]. Целью настоящего исследования явилось изучение действия суммарной РНК лимфоцитов бычьей селезенки

на гемопоэз крыс, подвергшихся гамма-облучению в сублетальной дозе, а также сравнение эффективности нативной и лиофилизированной форм указанной РНК.

Методика

Работа выполнена на 30 белых нелинейных крысах-самцах массой 200-220 г. 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». Суммарную РНК выделяли методом фенол – хлороформной экстракции из лимфоидных клеток бычьей селезенки. Для создания исходной миелосупрессии всех подопытных животных подвергали однократному общему воздействию гамма-излучения с источником ⁶⁰Co на установке Theratron Elite 80 (MDS Nordion, Канада) в дозе 6 Гр при мощности дозы 0,1 Гр/с. Облученных крыс разделили на 3 группы (по 10 крыс в каждой группе). Через 2 ч после облучения крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл 0,9% NaCl; крысам группы «РНКн» – нативную суммарную РНК, разведенную в 0,5 мл 0,9% NaCl (доза РНК 30 мкг/100г массы), крысам группы «РНКл» – лиофилизированную суммарную РНК, растворенную в 0,5 мл стерильного 0,9% NaCl (доза РНК 30 мкг/100г массы).

На 3-и, 7-е и 12-е сут в периферической крови облученных крыс определяли количество ретикулоцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, после чего животные были выведены из эксперимента с целью исследования костномозгового кроветворения. В мазках костного мозга, окрашенных по Романовскому-Гимза, определяли количество эритроидных, лимфоидных, мегакариоцитарных и разных форм миелоидных клеток. Для детальной характеристики центрального звена эритрона [4] из костного мозга выделяли эритробластические островки (ЭО) (erythroblastic islets, EIs), оценивая их состояние методами, разработанными в лаборатории культур тканей костного мозга Южно-Уральского медицинского университета [5,6]. ЭО дифференцировали на пролиферирующие (ЭО 1,2 классов и реконструирующиеся ЭО) и зрелые (ЭО 3 класса и инволюцирующие ЭО) морфо-функциональные клеточные ассоциации [7, 8]. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 19,0. Сравнения групп проводились с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и хи-квадрат, различия считались значимыми при *p*<0,05.

Результаты

Под влиянием ксеногенной суммарной РНК в периферической крови крыс (табл. 1) в 2-3 раза увеличи-

Таблица 1/ Table 1

Влияние нативной (РНКн) и лиофилизированной (РНКл) форм ксеногенной суммарной РНК на показатели периферической крови у облученных крыс

Influence of native (RNA_n) and lyophilized (RNA_l) forms xenogeneic total RNA on peripheral blood parameters in irradiated rats

Группы Groups	Ретикулоциты Reticulocytes (x 10 ⁹ /л)	Лейкоциты Leukocytes (x 10 ⁹ /л)	Тромбоциты Thrombocytes (x 10 ⁹ /л)
3-и сутки (day)			
Контроль Control	0,8±0,3	0,01±0,01	93,8±18,3
РНКн (RNA _n)	1,0±0,4	0,03±0,02	101,8±15,2
РНКл (RNA _l)	1,2±0,5	0,02±0,01	94,2±9,5
7-е сутки (day)			
Контроль Control	2,4±0,5	0,08±0,01	112,4±8,6
РНКн (RNA _n)	3,6±0,8	0,20±0,05*	116,4±12,9
РНКл (RNA _l)	3,4±0,7	0,26±0,03*	103,0±8,8
12-е сутки (day)			
Контроль Control	5,6±0,7	0,77±0,06	115,0±8,9
РНКн (RNA _n)	9,8±0,6*	1,12±0,1*	123,0±9,9
РНКл (RNA _l)	8,8±0,7*	1,06±0,05*	109,6±6,8

Примечание. 1) * – статистическая значимость различий по отношению к контрольной группе; 2) между опытными группами РНКн и РНКл значимых различий не выявлено.

Note. 1) *means the reliability of differences in relation to the control group; 2) no significant differences were found between the experimental groups of RNA_n and RNA_l).

Таблица 2/ Table 2

Влияние нативной (РНКн) и лиофилизированной (РНКл) форм ксеногенной суммарной РНК на показатели миелограммы у облученных крыс

Influence of native (RNA_n) and lyophilized (RNA_l) forms xenogeneic total RNA on effect on myelogram indices in irradiated rats

% Клеток (% of cells)	Контроль (Control)	РНКн (RNA _n)	РНКл (RNA _l)
Миелобласты Myeloblasts	0	0,2±0,05*	0,1±0,03*
Промиелоциты Promyelocytes	0	1,6±0,04*	1,8±0,2*
Миелоциты Myelocytes	1,1±0,2	3,1±0,1*	3,3±0,2*
Метамиелоциты Metamyelocytes	2,1±0,3	5,3±0,2*	4,9±0,1
Палочкоядерные нейтрофилы Rod neutrophils	30,2±0,9	18,6±0,7*	19,2±1,2*
Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	31,5±0,5	21,9±0,3*	21,3±0,8*
Эозинофилы Eosinophils	7,4±0,3	7,8±0,5	6,9±0,4
Базофилы Basophils	1,7±0,2	1,3±0,4	1,4±0,2
Лимфоидные клетки Lymphoid cells	0,2±0,05	9,5±0,4*	9,2±0,3*
Клетки эритроидного ряда (Erythroid cells)	25,3±0,6	32,6±0,8*	32±0,6*

Примечания. 1) * – статистическая значимость различий по отношению к контрольной группе 2) между опытными группами РНКн и РНКл значимых различий не выявлено.

Note. 1) *means the reliability of differences in relation to the control group; 2) no significant differences were found between the experimental groups of RNA_n and RNA_l.

Таблица 3/ Table 3

Влияние нативной (РНКн) и лиофилизированной (РНКл) форм ксеногенной суммарной РНК на показатели периферической крови у облученных крыс

Influence of native (RNA_n) and lyophilized (RNA_l) forms xenogeneic total RNA on peripheral blood parameters in irradiated rats

Группы Groups	Ретикулоциты Reticulocytes (x 10 ⁹ /л)	Лейкоциты Leukocytes (x 10 ⁹ /л)	Тромбоциты Thrombocytes (x 10 ⁹ /л)
3-и сутки (day)			
Контроль Control	0,8±0,3	0,01±0,01	93,8±18,3
РНКн (RNA _n)	1,0±0,4	0,03±0,02	101,8±15,2
РНКл (RNA _l)	1,2±0,5	0,02±0,01	94,2±9,5
7-е сутки (day)			
Контроль Control	2,4±0,5	0,08±0,01	112,4±8,6
РНКн (RNA _n)	3,6±0,8	0,20±0,05*	116,4±12,9
РНКл (RNA _l)	3,4±0,7	0,26±0,03*	103,0±8,8
12-е сутки (day)			
Контроль Control	5,6±0,7	0,77±0,06	115,0±8,9
РНКн (RNA _n)	9,8±0,6*	1,12±0,1*	123,0±9,9
РНКл (RNA _l)	8,8±0,7*	1,06±0,05*	109,6±6,8

Примечание. 1) * – статистическая значимость различий по отношению к контрольной группе; 2) между опытными группами РНКн и РНКл значимых различий не выявлено.

Note. 1) *means the reliability of differences in relation to the control group; 2) no significant differences were found between the experimental groups of RNA_n and RNA_l).

лось количество лейкоцитов и в 1,6-1,75 раза возросло число ретикулоцитов. В костном мозге (табл. 2) наблюдались увеличение количества пролиферирующих миелоидных и лимфоидных элементов, а также рост общего числа клеток эритроидного ряда. При углубленном изучении состояния костномозгового эритропоэза было установлено (табл. 3), что ксеногенная суммарная РНК стимулирует образование ЕIs как на основе контакта свободных костномозговых макрофагов с молодыми эритроидными клетками (ЭО 1 и 2 классов), так и на основе процесса реконструкции (ЭО реконструирующиеся). При сравнительном анализе эффектов нативной и лиофилизированной суммарной РНК были получены данные об отсутствии различий между используемыми формами введенных животным препаратов.

Заключение

Суммарная РНК, выделенная из лимфоидных клеток бычьей селезенки, активирует гемопоэз у крыс с постлучевой миелосупрессией, что свидетельствует об отсутствии ксеногенных ограничений у млекопитающих в известных механизмах лимфоцитарного контроля восстановительных процессов [9, 10]. Лиофилизированная форма препарата суммарной РНК активирует костномозговое кроветворение в те же сроки и в том же объеме, что и нативная форма.

Литература

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Харченко М.Ф., Корнилова Н.В., Захаров Ю.М., Битюкова Е.С. Гликозаминогликаны эритробластических островков костного мозга крыс. *Физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 1994; 80(11): 32-6.
5. 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.

Сведения об авторах:

Тишевская Наталья Викторовна, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии им. акад. Ю.М. Захарова ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»;

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

Позина Анастасия Александровна, студентка 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет».

6. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние эритропоэтина и макрофагального колониестимулирующего фактора на пролиферативную активность эритроидных клеток в культуре эритробластических островков. *Медицинский академический журнал.* 2003; 3(3): 67-72.
7. 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.
8. Тишевская Н.В., Болотов А.А., Захаров Ю.М. Математическое моделирование межклеточных взаимодействий в культуре эритробластических островков. *Медицинский академический журнал.* 2005; 5(4): 50-9.
9. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. *Успехи современной биологии.* 2016; 136(1): 83-96.
10. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2016; 102(11): 1280-301.

References

1. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zakharov Y.M. Correction of radiation damage of erythropoiesis using bone marrow and thymus total RNA. *Radiation biology. Radioecology.* 2017; 57(4): 384-90. (In Russian)
2. 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.* 2019; 63(2): 56-64.
3. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Ju.O., Ragimov A.A. On the hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes in patients with true polycythemia and healthy donors. *Onkogematologiya.* 2015; 10(2): 58-62. (In Russian)
4. Kharchenko M.F., Kornilova N.V., Zakharov Yu.M., Bitjukova E.S. Glycosaminoglycans of rat bone marrow erythroblastic islets. *Physiological journal im. Sechenova.* 1994; 80(11): 32-6. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A., Zakharov Yu. M. The effect of humoral factors on phagocytic activity of central macrophages in the erythroblastic islets culture. *Rossiyskiy fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2002; 88(9): 1191-8. (In Russian)
6. Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M. The effect of erythropoietin and macrophage colony stimulating factor on the proliferative activity of erythroid cells in erythroblastic islets cultures. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal.* 2003; 3(3): 67-72. (In Russian)
7. Volchegorskii I.A., Tishevskaya N.V., Dement'eva E.V. Antianemic effect of reamberin in rats with acute alloxan-induced diabetes. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2008; 71(6): 23-7. (In Russian)
8. Tishevskaya N.V., Bolotov A.A., Zakharov Yu.M. Mathematical modeling of intercellular interactions in the erythroblastic islets culture. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal.* 2005; 5(4): 50-9. (In Russian)
9. 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)
10. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The role of lymphocytic RNA in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2016; 102(11): 1280-301. (In Russian)