

УДК 577.117:612.017:612.014.48

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ИММУНОЛОГИИ СТЕВоловой КЛЕТКИ

Н. В. Беляева

ГУ “Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, г. Киев

Ключевые слова: иммунная система, CD34 позитивные клетки, стволовые клетки, ионизирующая радиация.

Антигенно-структурный или иммунный гомеостаз — это организованное функциональное и структурное единство взаимодействующих звеньев иммунной системы, ее клеточных и неклеточных элементов, главная функция которого — регуляторная: контроль и поддержание гено- и фенотипической индивидуальности организма. Дополнительные воздействия на иммунную систему (ИС) в целом существенно увеличивают фенотипическое разнообразие выполнения этой регуляторной функции, которое объясняется не столько неэффективностью работы отдельных элементов ИС, сколько несбалансированностью их взаимодействия. При действии ионизирующего излучения эффективность осуществления иммунной регуляторной функции в значительной степени определяется динамической реакцией клеточного звена иммунитета [1–4]. Межклеточные взаимодействия происходят через сигнальные молекулы. Специфика реакции клетки сопряжена с набором экспрессируемых ею или находящихся внутри ее рецепторов, которые в случае восприятия сигнала связываются с соответствующим лигандом. Эндофенотип клетки, уровень метаболизма и состояние ее микроокружения ответственны на всех этапах действия сигнальных молекул на клетку [5].

Исследования, проведенные нами ранее, с использованием экспериментальных методов, кинетического анализа, математического моделирования, клеточных моделей показали, что у лиц, подвергшихся радиационному воздействию, наблюдается постепенное, пространственно-временное “размывание” характеристик функций иммунного гомеостаза как адаптивной, неадекватной действию факторов перестройки при общей тенденции в сторону ухудшения. А накопление мутаций, цитогенетических повреждений скорее отражает регуляторное снижение скорости клеточного самообновления и эффективности иммунного надзора [6–9].

У участников ликвидации последствий аварии (УЛПА) на ЧАЭС в отдаленном периоде и у лиц, выполняющих работы в условиях кратко-

временного (продолжительного) действия ионизирующего излучения в низких дозах, установлено, что миграционные потоки и пролиферация иммунокомпетентных клеток и их предшественников, стволовых клеток и ранних предшественников гемопоэза, а также формирование клеточных ассоциаций изменены. Получены доказательства ассоциированности интенсивности мутационного процесса в клетках крови (по частоте TCR-мутантных лимфоцитов) с дестабилизацией функционирования кроветворного стволово-клеточного компартмента и общей реакцией клеточного звена иммунитета. В иммунном статусе прослеживается некоторая однонаправленность популяционных и субпопуляционных структурных изменений: заметная активация В-клеток на фоне относительной лимфопении и дисбаланса в Т-клеточном звене, мера выраженности которых сопряжена с величиной, категорией дозы и длительностью периода, прошедшего после радиационного воздействия [6–8, 10].

Результаты экспериментального исследования, проведенного нами на аккумуляционных клеточных моделях с использованием линии иммортализованных нормальных hTERT-BJ1 фибробластов, которые по своим биологическим характеристикам близки человеческим стволовым клеткам, показали, что хроническое воздействие γ -излучения реакторного спектра при мощности доз от 0,2 Гр/год до 1,0 Гр/год и кумулятивных дозах от 14 мЗв до 1,126 Зв на культуры клеток hTERT-BJ1 вызывает радиоиндуцированный эффект в виде генотоксического клеточного повреждения. Механизм этого эффекта определялся растянутым во времени формированием (перераспределением) поглощенной дозы и восстановительными процессами, развивающимися параллельно в соответствии с клеточным генотипом. Кривые “доза — время — эффект” носили нелинейный характер. hTERT-BJ1 клетки с уровня накопленных доз от 0,167 Зв до 0,666 Зв приобрели радиорезистентность. Однако к концу наблюдения показатели МЯ/1000ДК (количество микроядер на 1000 двужядерных клеток) в культурах hTERT-BJ1 клеток не достигли исходных значений и с высокой степенью достоверности превышали уровень в интактных контролях. Такой эффект *in vivo* способен снижать жесткость барьера, который обеспечивается зоной межклеточных взаимодействий при иммунологическом надзоре [9, 10].

Результаты исследования *in vitro* феномена инактивации несингенных стволовых клеток с использованием Т- и В-лимфоцитов периферической крови лиц, подвергшихся радиационному воздействию, позволили нам сделать заключения, которые в совокупности можно рассматривать как фундаментальное обоснование принципиальной возможности осуществ-

вления функции иммунного надзора при влиянии радиационного фактора на систему иммунитета в целом. Описана модель лимфоцитарного контроля размера пула стволовых клеток и ранних предшественников гемопоэза, которая позволяет изучать межклеточные взаимодействия на эффекторной стадии клеточного иммунитета. С помощью этой математической/компьютерной модели были показаны решения условий, при которых подсистема генерации гемопоэтических стволовых клеток может утратить динамическую устойчивость и осуществить неконтролируемый или увеличенный выброс клеточных форм наиболее ранних стадий дифференцирования в периферическую кровь [10, 11].

В норме количество CD34 позитивных клеток очень мало в периферической крови. Эта минорная популяция содержит стволовые клетки и клетки-предшественники гемопоэза. При действии ионизирующего излучения численность циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток и ранних предшественников увеличивается. Поверхностно-мембранный фенотип этих клеток также претерпевает изменения [12, 13]. Результаты, проведенных нами исследований по идентификации CD34 позитивных клеток в периферической крови лиц, подвергшихся радиационному воздействию (УЛПА, рабочие зоны ЧАЭС, кадровые работники), подтвердили эти данные. Фенотипическое разнообразие циркулирующего пула CD34 позитивных клеток было сопряжено с дозовыми характеристиками и длительностью периода, прошедшего после радиационного воздействия. Пропорции клеток с фенотипами CD34⁺ PCNA⁺ и CD34⁻ PCNA⁺ в циркулирующем CD34⁺ пуле у лиц, подвергшихся радиационному воздействию, превышали уровень контроля в 7–10 раз [10, 11]. Этот факт можно рассматривать как свидетельство сохранения высокопролиферативного статуса вышедшей из костного мозга в периферический кровоток популяции стволовых клеток и ранних предшественников, что необходимо для предотвращения индукции апоптоза, поскольку в настоящее время неизвестны агенты, способные вызвать блок клеточного цикла без последующего запуска гибели клеток или индукции дифференцировки.

Динамическое исследование количественных характеристик циркулирующего пула CD34-положительных клеток у УЛПА, перенесших в 1986 году острую лучевую болезнь, (средняя кумулятивная доза $2,91 \pm 0,41$ Зв) показало достоверное снижение общего количества CD34⁺ клеток в периферическом кровотоке. Однако число клеток, экспрессирующих только один маркер “стволовости” — CD34, через 2–3 года после проведения первого исследования осталось неизменным. У лиц, выполняющих работы в условиях кратковременного (продолженного) дей-

ствия ионизирующего излучения в низких дозах (средняя эффективная доза в первом исследовании $7,56 \pm 0,88$ мЗв, во втором — $10,04 \pm 0,98$ мЗв) достоверных различий по аналогичным показателям установить не удалось [10]. Полученные результаты означают, что CD34 позитивные клетки, находящиеся в периферической крови и обладающие мощным потенциалом выживания могут обеспечить резервуар для поколения и распространения мутантных клеток, которые вносят отрицательный вклад в патогенез заболеваний в виде неполноценной регенерации поврежденных тканей, устойчивости к терапии, неадекватных клеточных реакций, что находит подтверждение в литературе [14–17].

Существует предположение, что CD34⁺ циркулирующие клетки являются мощными регуляторами организменной ангиогенной и провоспалительной реакции, что не исключает их возможную роль в модернизации сосудистых поражений и патологического процесса [18]. Таким образом, наличие постоянного присутствия повышенной численности стволовых клеток и ранних предшественников гемопоэза в периферическом кровотоке имеет прогностическое значение. Тогда как высокое значение количества циркулирующих клеток с преимущественной презентацией маркера “стволовости” CD34 (наиболее примитивные клетки) можно расценивать как необратимую компоненту радиоиндуцированного поражения костного мозга с потенциальной вероятностью вклада в реализацию отдаленных последствий радиационного воздействия на организм.

Еще недавно игнорируемая концепция, что стволовые клетки в тканях могут быть мишенью канцерогенеза, в последние годы стала рассматриваться и в радиобиологии. Толчком к энтузиазму вокруг этой области исследований послужили изменения фундаментальных основ классических представлений о последствиях действия ионизирующего излучения на клетку [19–22]. В настоящее время широко обсуждаются имеющиеся свидетельства о “продолжающемся” (пространственно-временном) радиоиндуцированном повреждении костного мозга с вовлечением компартмента стволовых клеток и их радиоиндуцированной “мобилизацией” в периферический кровоток [23–26]. В то же время присутствие стволовых клеток и предшественников в микроокружении опухоли расценивают как результат активного кооптирования их из костного мозга и близлежащих тканей [27]. Среди факторов, способных модифицировать скорость инициирования промежуточных клеточных форм и темпы их распространения, межклеточному взаимодействию отводится особая роль [28]. Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что межклеточные взаимодействия являются важным механизмом опухолевой прогрессии,

включая стохастическое исчезновение пред- и злокачественных клеток, подавление иммунитета, возможные радиационные последствия, ангиогенез [29–34]. Подчеркивается необходимость учета этих составляющих при оценке радиационных рисков онкозаболеваний [35–37].

В связи с вышеизложенными результатами наших исследований, литературными данными, а также в контексте современных представлений об иммунологическом надзоре и концепции опухолевых стволовых клеток изучение межклеточных взаимодействий при осуществлении иммунологического надзора, контроле размера пула стволовых клеток и ранних предшественников гемопоэза, их миграционной активности у лиц, подвергшихся радиационному воздействию, на сегодня является одной из важнейших задач современной экспериментальной биологии и медицины. Мы полагаем, что такая задача может решаться с применением двух подходов. Это — получение дополнительной информации на основании исследований свойств клеток *in vitro* и применение новых методов обработки информации к уже имеющимся наборам “рутинных” клинико-лабораторных показателей.

ЛИТЕРАТУРА

1. О реакции клеточной популяции на облучение в малых дозах [Текст] / А. М. Себрелянский [и др.] // Рад.биол. Радиоэкол. — 2007. — Т. 47, № 1. — С. 93–99.
2. Орадовская, И. В. Динамика показателей иммунного статуса ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС в отдаленном периоде [Текст] / И. В. Орадовская // Рад. биол. Радиоэкол. — 2006. — Т. 46, № 3. — С. 348–373.
3. Kusunoki, Y. Long-lasting alterations of the immune system by ionizing exposure: implication for disease development among atomic bomb survivors [Text] / Y. Kusunoki, T. Hayashi // Int. J. Radiat. Biol. — 2008. — Vol. 84(1). — P. 1–14.
4. World Health Organization. Health effects of the Chernobyl forum expert group “Health” (EGH): [materials]. — Geneva: WHO, 2005. — 171 p.
5. Межклеточные взаимодействия [Текст] / Под ред. М. А. Пальцева, А. А. Иванова — Медицина, 1995. — 224 с.
6. Імунологічні ефекти у постраждалих внаслідок аварії [Текст] / Д. А. Бази́ка [та ін.] // Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції / За ред. О. Ф. Возіанова, В. Г. Бебешка, Д. А. Бази́ки — К.: ДІА, 2007. — С. 363–407.
7. Радіобіологічні закономірності дії низьких та наднизьких рівнів опромінення на організм людини — досвід Чорнобилю [Текст] / Д. А. Бази́ка [та ін.] // Ж. АМН України. — 2006. — Т. 12, № 1. — С. 110–124.
8. Bazyka, D. Immune function in exposed after Chernobyl [Text] / D. Bazyka, A. Chumak, N. Belyaeva // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології: Збірник наук. праць. — К., 2004. — Вип 10. — С. 231–254.
9. Беляева, Н. В. Адаптивный ответ hTERT-BJ1 immortalized нормальных фибробластов человека при длительном воздействии низкодозового излучения Чернобыльского спектра: результаты экспериментального исследования [Текст] / Н. В. Беляева, Д. А. Бази́ка // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології: збірник наук. праць. — К.: ДІА, 2007. — Вип 13. — С. 47–55.

10. *Беляева, Н. В.* Клітинні механізми формування радіаційних ефектів в імунній системі у віддаленому періоді Чорнобильської аварії (клініко-експериментальне дослідження): Автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.01 [Текст] / Беляева Надія Володимирівна. — К., 2009. — 40 с.
11. *Беляева, Н. В.* Эффект взаимодействия *in vitro* лимфоцитов лиц, подвергшихся радиационному воздействию, с аллогенными стволовыми клетками (исследование феномена инактивации несингенных стволовых клеток) [Текст] / Н. В. Беляева // Проблемы радиационной медицины та радіобіології: Збірник наук. праць. — К.: ДІА, 2010. — Вип 15. — С. 256–261.
12. *Barcellos-Hoff, M. H.* Radiation and the microenvironment-tumorigenesis and therapy [Text] / *M. H. Barcellos-Hoff, C. Park, E. G. Wright* // *Nat. Rev. Cancer*. — 2005. — Vol. 5(11). — P. 867–875.
13. Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation [Text] / *W. Li* [et al.] // *Exp. Hematol.* 2004. — Vol. 32(11). — P. 1088–1096.
14. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells [Text] / *M. Kim* [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2002. — Vol. 8. — P. 22–28.
15. Bone marrow CD34⁺ progenitors cells from rheumatoid arthritis patients support spontaneous transformation in the peripheral blood B cells from individuals [Text] / *S. Hirohata* [et al.] // *Rheumatology International*. — 2000. — T. 19, № 4. — С. 153–159.
16. *Аклеев, А. В.* Реакции тканей на хроническое воздействие ионизирующего излучения / А. В. Аклеев // *Рад.биол. Радиоэкол.* — 2009. — Т. 49, № 1. — С. 5–20.
17. *Гольдберг, Е. Д.* Механизмы регуляции системы крови при кислородной недостаточности и участие нейтральных стволовых клеток в адаптации и гипоксии / Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, Г. Н. Зюзьков // *Бюлл. сибир. мед.* — 2006. — № 2. — С. 44–50.
18. Circulating CD34⁺ progenitor cells modulate host angiogenesis and inflammation *in vivo* / *E. R. Papa* [et al.] // *J. Mol. Cell Cadiol.* — 2006. — Vol. 41(1). — P. 86–96.
19. *Mothersill, C.* Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: an “out of field” perspective [Text] / *C. Mothersill, C. B. Seymour* // *Mutat. Res./Fund. Mol. Mech. Mutagen.* — 2006. — Vol. 597(1–2). — P. 5–10.
20. *Prise, K. M.* New advances in radiation biology [Text] / *K. M. Prise* // *Occupat. Vtd. (Long)*. — 2006. — Vol. 56(3). — P. 156–161.
21. The debate on the use of linear no threshold for assessing the effects of low doses / *M. Tubiana* [et al.] // *Radiol. Protec.* — 2006. — Vol. 26(3). — P. 317–324.
22. *Little, J. B.* Taylor lecture: nontargeted effects of radiation: implications for low-doses exposure [Text] / *J. B. Little, S. Lauriston* // *Health Phys.* — 2006. — Vol. 91(5). — P. 416–426.
23. Chromosomal instability in unirradiated hemopoietic cells resulting from delayed *in vivo* bystander effect of gamma radiation [Text] / *S. A. Lorimore* [et al.] // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65(13). — P. 5668–5673.
24. *Wright, E. G.* Microenvironmental and genetic factors in haemopoietic radiation responses [Text] / *E. G. Wright* // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2007. — V. 83(11). — P. 813–818.
25. *Wright E. G.* Untargeted effects of ionizing radiation: implications for radiation pathology [Text] / *E. G. Wright, P. J. Coates* // *Mutat. Res./Fund. Mol.Mech. Mutagen.* — 2006. — Vol. 597(1–2). — P. 119–132.
26. Radiation sensitivity and genomic instability in the hematopoietic system: Frequencies of micronucleated reticulocytes in whole-body X-irradiated BALB/c and C57BL/6 mice [Text] / *K. Hamasaki* [et al.] // *Cancer Sci.* — 2007. — Vol.98. — P. 1840–1844.
27. *Melero-Martin, J. M.* Concise review: vascular stem cells and tumor angiogenesis [Text] / *J. M. Melero-Martin, A. C. Dudley* // *Stem cells.* — 2011. — Vol. 29(2). — P. 163–168.

28. *Trosko, J. E.* Adult stem cells, the Barker hypothesis, epigenetic events, and low-level radiation effects [Text] / J. E. Trosko, K. Suzuki // Radiation health risk sciences. Proceedings of the First International Symposium of the Nagasaki University Global COE Program "Global strategic center for radiation health risk control" / Eds. M. Nakashima, N. Takamura, K. Tsukasaki, Y. Nagayama, S. Yamashita. — Springerlink, 2009. — Part 7. — P. 216–226.
29. *Shipitsin, M.* The cancer stem cells hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance [Text] / M. Shipitsin, K. Polyak // Laboratory Investigation. — 2008. — Vol. 88. — P. 459–463.
30. Low-dose ionizing radiation; induction of differential intracellular signaling possibly affecting intercellular communication [Text] / J. E. Trosko [et al.] // Radiat. Environ. Biophys. — 2005. — Vol. 44. — P. 3–9.
31. *Kakalara, M.* Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy [Text] / M. Kakalara, M. S. Wicha // J. Clin. Oncol. — 2008. — Vol. 26. — P. 2813–2820.
32. *Reiman, J. M.* Immune promotion of epithelial-mesenchymal transition and generation of breast cancer stem cells [Text] / J. M. Reiman, K. L. Knutson, D. C. Radisky // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70(8). — P. 3005–3008.
33. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition *in vivo* generates breast cancer stem cells [Text] / M. Santisteban [et al.] // Cancer Res. — 2009. — Vol. 69(7). — P. 2887–2895.
34. Radiation-induced signaling: inside-out and outside-in [Text] / K. Valerie [et al.] // Cancer Theor. — 2007. — Vol. 3. — P. 789–801.
35. A model for radiation-induced bystander effects, with allowance for spatial position and the effects of cell turnover [Text] / M. P. Little [et al.] // J. Theor. Biol. — 2005. — Vol. 232. — P. 329–338.
36. Stochastic population dynamic effects for lung cancer progression [Text] / H. Fakir [et al.] // Radiat. Res. — 2009. — Vol. 172(3). — P. 383–393.
37. The balance between initiation and promotion in radiation-induced murine cancerogenesis [Text] / I. Shuryak [et al.] // Radiat. Res. — 2010. — Vol. 174. — P. 357–366.

ПЕРСПЕКТИВИ ДОСЛІДЖЕНЬ У ГАЛУЗІ ІМУНОЛОГІЇ СТОВБУРОВОЇ КЛІТИНИ

Н. В. Беляєва

ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ

На підставі аналізу власних і літературних даних про стан імунітету у осіб, які зазнали радіаційного впливу, властивості і функції циркулюючих стовбурових клітин і ранніх попередників гемопоєзу, лимфоцитарном контролі розміру пулу CD34 позитивних клітин обґрунтовується перспективний напрям наукових досліджень.

Ключові слова: імунна система, CD34 позитивні клітини, стовбурові клітини, іонізуюча радіація.

PROSPECTS OF RESEARCH IN IMMUNOLOGY OF STEM CELLS

N. V. Belyaeva

*SI "National Research Centre for Radiation Medicine,
National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv*

Based on the analysis of own and literature data on the state of immunity in persons exposed to radiation, the properties and functions of circulating stem cells and early precursors of hemopoiesis and lymphocytic control of the pool CD34 positive cells is justified promising area of research.

Key words: immune system, CD34 positive cells, stem cells, ionizing radiation.