DOI: 10.15825/1995-1191-2018-3-64-69

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТОРНОЙ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЩЕЙ РНК КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

З.З. Гоникова¹, А.О. Никольская¹, Л.А. Кирсанова¹, М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, Н.А. Онищенко¹, В.И. Севастьянов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Цель. Установить способность суммарной РНК, выделенной из ККМ организма, в котором повреждена ткань печени, служить переносчиком адресных регенерационных сигналов именно в этот орган. **Материалы и методы.** Методом адоптивного переноса на крысах ($n = 37$) изучена митотическая и пролиферативная активность клеток печени и почек у интактных реципиентов после внутривентрального введения: моноклеарных клеток костного мозга (ККМ) – $2,5 \times 10^6$; $5,0 \times 10^6$; $3,5 \times 10^7$ клеток – группа 1 и общей РНК из таких же ККМ (30 мкг/100 г веса) – группа 2 от доноров через 12 часов после 70–75% гепатэктомии; в группе 3 (контроль) вводили физраствор. РНК из ККМ выделяли методом, разработанным фирмой «Евроген» (Россия) с помощью реактива ExtractRNA. **Результаты.** В группе 2 на сроках 48 и 72 ч. отмечено увеличение митотической и пролиферативной активности клеток в печени, но не в почках (контроль специфичности регенерационных сигналов); в группе 1 не выявлен перенос регенерационных сигналов в эти органы. **Заключение.** Авторы полагают, что общая РНК из активированных гепатэктомией ККМ аккумулирует адресные (гепатоспецифические) регенерационные сигналы, но воспроизводятся они лишь при поступлении РНК в поврежденную ткань.

Ключевые слова: клетки костного мозга, РНК, регенерация печени.

INVESTIGATION OF REGENERATIVE AND TISSUE-SPECIFIC ACTIVITY OF TOTAL RNA OF BONE MARROW CELLS

Z.Z. Gonikova¹, A.O. Nikolskaya¹, L.A. Kirsanova¹, M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, N.A. Onishchenko¹, V.I. Sevastyanov¹

¹ V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

Aim. To establish the ability of the total RNA extracted from the body's bone marrow cells (BMCs), in which liver tissue was damaged, to serve as a carrier of targeted regenerative signals to this organ. **Materials and methods.** By method of adoptive transfer in rats ($n = 37$) the mitotic and proliferative activity of liver and kidney cells were studied in intact recipients after intraperitoneal injection: the mononuclear BMCs – $2,5 \times 10^6$; $5,0 \times 10^6$; $3,5 \times 10^7$ cells – group 1 and the total RNA of the same BMCs (30 μg/100g of weight) – group 2 from donors in 12 hours after 70–75% of hepatectomy; in group 3 (control), a saline solution was injected. RNA from BMCs was extracted by the method developed by the «Evrogen» firm (Russia) with the reagent Extract RNA. **Results.** In group 2 in 48 and 72 h. there was the increasing of mitotic and proliferative cell activity in the liver, but not in the kidneys (control of the specificity of regenerative signals); in group 1 there was no transfer of regenerative signals to these organs. **Conclusion.** The authors believe that the total RNA from BMCs, activated by

Для корреспонденции: Гоникова Залина Залимгериевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (966) 188-33-33. E-mail: zalina3392@gmail.com

For correspondence: Gonikova Zalina Zalimgerievna. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (966) 188-33-33. E-mail: zalina3392@gmail.com

hepatectomy, accumulates targeted (hepatospecific) regeneration signals, but they are perceived only when RNA has been obtained by the damaged tissue.

Key words: bone marrow cells, RNA, liver regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Общепризнано, что повреждение органов и тканей через механизмы ауторегуляции включает в организме эволюционно выработанные процессы их регенерации, причем адресный перенос регенерационной информации в поврежденные ткани осуществляют лимфоциты крови [1–3], имеющие, как известно, костномозговое происхождение. Сами клетки костного мозга (гемопэтические и стромальные) также обладают высоким регенерационным потенциалом, и это предопределило их широкое использование в последние годы для индукции восстановительных процессов в поврежденных органах и тканях. Между тем механизмы, с помощью которых эти клетки осуществляют адресную доставку регенерационных сигналов в поврежденную ткань, остаются малоизученными. Показано, что выработка клетками костного мозга (ККМ) адресных регенерационных сигналов сопровождается появлением у этих клеток паракринных свойств [4–8], а это свидетельствует о происходящем репрограммировании их генома при запуске регенерационного процесса. Анализ возможных механизмов репрограммирования генома ККМ при восстановительных процессах позволил связать их с недавно открытым классом многочисленных регуляторных белок-некодирующих РНК в клетках, и прежде всего с молекулами микро-РНК (к настоящему времени выделено свыше 3000 различных микро-РНК) [9, 10]. В то же время имеются данные, что РНК в клетках представляет собой систему сигнальных молекул различных классов, результирующий регуляторный эффект которых достигается взаимодействием многочисленных белок-некодирующих РНК (микро-РНК, малые интерферирующие РНК, малые ядерные РНК, длинные некодирующие РНК и др.) и белок-кодирующих РНК [9, 11, 12]. Представление об определяющей регуляторной роли комплекса различных классов РНК в клетках позволило уже в настоящее время применять экзогенную суммарную РНК из лимфоцитов периферической крови или ККМ донора для эффективной индукции восстановительных процессов в самом костном мозге при различных патологических состояниях кроветворной системы [2, 3, 13, 14].

Цель настоящей работы: установить, способна ли суммарная РНК, выделенная из ККМ организма, в котором повреждена ткань иного гистотипа, например, ткань печени, служить переносчиком адресных регенерационных сигналов именно в этот орган.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на крысах-самцах породы Вистар весом 250–300 г ($n = 37$). Способность суммарной РНК из ККМ к аккумуляции регенерационных сигналов и доставке их именно в ткань поврежденного органа (печень) для активации в ней регенерационных процессов изучали методом адоптивного переноса [1]. Для доказательства способности суммарной РНК из ККМ при повреждении печени осуществлять перенос регенерационной информации использовали экспериментальную модель частичной гепатэктомии (70–75% резекция печени), которая, как известно, сопровождается активацией механизмов гипертрофической регенерации с выраженной митотической активностью в оставшейся части органа [15]. Крысы с частичной гепатэктомией составили донорскую группу ($n = 10$). У крыс-доноров забирали костный мозг через 12 часов после резекции печени (указанный интервал, необходим для появления в костном мозге морфогенетически активных клеток) и получали из него моонуклеарную (гемопэтическую) фракцию ККМ. Для выявления у этих клеток адресной (гепатоспецифической) индукционной активности выделенную фракцию донорских моонуклеарных ККМ вводили однократно внутрибрюшинно интактным (неоперированным) крысам-реципиентам ($n = 27$) либо в виде свежевыделенных активированных гепатэктомией моонуклеарных ККМ в дозе: $2,5 \times 10^6$, или $5,0 \times 10^6$, или $3,5 \times 10^7$ клеток на крысу ($n = 12$; группа 1) либо в виде общей (суммарной) РНК, предварительно полученной из таких же ККМ, в дозе 30 мкг/100 г веса животного ($n = 10$; группа 2). Контролем служили интактные крысы с введением 1,0 мл физиологического раствора ($n = 5$; группа 3). Общую РНК из моонуклеарной фракции ККМ выделяли методом, разработанным фирмой «Евроген» (Россия) с помощью реактива ExtractRNA, который позволял получить из каждой $3,5 \times 10^7$ клеток от 105,5 до 127,7 мкг суммарной РНК. Способность к аккумуляции и переносу регенерационных сигналов именно в печень при использовании моонуклеарной фракции ККМ, а также выделенной из них общей РНК оценивали по выраженности индукции пролиферативной активности гепатоцитов печени и канальцевого эпителия почек (контроль адресного воздействия) у неоперированных крыс-реципиентов через 24, 36, 48 и 72 часа после введения им донорского материала. В указанные сроки иссекали печень и почки у крыс-реципиентов, готовили из них гистологические срезы, проводили окраску их гематоксили-

ном и эозином и, используя микроскоп фирмы Leica DMLS (Германия), определяли в 30 полях зрения количество митотически делящихся клеток, а затем рассчитывали митотический индекс (МИ) в промил-

Рис. 1. Гистологические препараты печени здоровой крысы через 48 часов после введения донорского материала от крысы с 70–75% гепатэктомией: а – после введения мононуклеарных клеток костного мозга ($3,5 \times 10^7$ кл.), умеренная лимфоидно-клеточная инфильтрация, митозов нет; б – после введения общей РНК из мононуклеарных клеток костного мозга (30 мкг/100 г), пролиферативная активность гепатоцитов в печени, митозы в паренхиме печени (указано стрелками). Гематоксилин и эозин, $\times 200$

Fig. 1. Histological specimens of the healthy rat liver in 48 hours after donor material infusion from rats with 70–75% hepatectomy: а – after infusion of the bone marrow mononuclear cells ($3,5 \times 10^7$ cells), moderate lymphoid cell infiltration, mitotic activity is absent; б – after infusion of the total RNA from the bone marrow mononuclear cells (30 μ g/100 g), proliferative activity of hepatocytes in the liver, mitoses take place in the liver parenchyma (indicated by arrows). Hematoxylin – eosin, $\times 200$

ле (%). Выраженность пролиферативной активности гепатоцитов печени оценивали также иммуногистохимически с помощью антител Ki-67, являющихся маркерами ядерного антигена пролиферирующих клеток и путем подсчета общего количества гепатоцитов в исследуемых полях зрения. Достоверность различия исследуемых показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью параметрического критерия t Стьюдента, при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование результатов адоптивного переноса донорского материала – фракции активированных гепатэктомией донорских мононуклеарных ККМ (группа 1) и общей РНК, выделенной из этих активированных ККМ (группа 2), показало, что в группе 1 на всех исследуемых сроках и при использовании разных доз активированных ККМ достоверные изменения митотической активности гепатоцитов в печени и канальцевого эпителия в почках неоперированных крыс-реципиентов отсутствуют: значения МИ для печени и почек не превышали $\sim 0,02 \pm 0,01\%$ (0–2 митоза на 30 полей зрения) и так же, как и в группе 3 (введение физиологического раствора, контроль), не отличались от исходных значений. Однако в отличие от группы 3 в группе 1 на сроках 48 и 72 часа при введении разных доз клеток нами было диагностировано появление в ткани печени клеточной инфильтрации (рис. 1, а), свидетельствующей о появлении в организме реципиентов гепатоспецифических сигналов.

Отсутствие подъема митотической активности гепатоцитов в печени здоровых крыс-реципиентов на введение активированных гепатэктомией мононуклеарных ККМ, в том числе в больших дозах, было для нас неожиданным. Мы полагали, что если на введение лимфоцитов селезенки донора, предварительно активированных частичной гепатэктомией, в организме реципиента достоверно возрастает митотическая активность не только гепатоцитов, но и клеток Купфера [1], то аналогичного повышения митотической активности гепатоцитов в печени реципиента следует ожидать и после введения им ККМ, активированных в организме донора 70–75% гепатэктомией.

Однако достоверный подъем митотической активности гепатоцитов в печени здоровых крыс-реципиентов и его последующее снижение были выявлены нами только в группе 2 на сроках 48 и 72 часа, где МИ составил $0,7 \pm 0,2\%$ (митозы выявлялись в 5–7 из 30 исследуемых полей зрения) и $0,5 \pm 0,2\%$ (митозы выявлялись в 3–4 из 30 исследуемых полей зрения) соответственно, при $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем (рис. 1, б). Кроме того, важно отметить, что в группе 2 с введением РНК, так же,

как и в группе 1 с введением моноклеарных ККМ, на сроках 48 и 72 часа нами в ткани печени также диагностировалась клеточная инфильтрация. Примечательно, что всплеск митотической активности гепатоцитов в печени именно через 48 часов был отмечен другими исследователями в опытах с выполнением у животных истинной субтотальной резекции печени [15]. Между тем в почках крыс-реципиентов группы 2 на сроках 48 и 72 часа достоверного повышения митотической активности клеток почечного эпителия выявлено не было, хотя известно, что после выполнения односторонней нефрэктомии в организме донора и переносе донорских лимфоцитов (спленоцитов) реципиенту через 48 часов в его организме отмечается максимум митотической активности клеток канальцевого эпителия [1]. При исследовании пролиферативной активности гепатоцитов в группе 2 было установлено, что в гистологических препаратах на этом сроке по сравнению с контролем (группа 3) определяется достоверно большее количество молодых гепатоцитов (клетки малого размера) – $452 \pm 7,66$ против $320 \pm 36,13$ ($p \leq 0,05$), которые располагаются преимущественно по периферии печеночной долики (рис. 2). Иммуногистохимическое исследование с помощью маркера Ki67 также подтвердило, что на сроке 48 часов пролиферативная активность клеток существенно возрастала в печени крыс группы 2 (рис. 3), но на сроке 72 часа пролиферативная активность снижалась, также как и митотическая активность к этому сроку.

Возможно, что спад митотической и пролиферативной активности через 72 часа после введения РНК наступает в результате активации другой популяции лимфоцитов, обладающей супрессорными свойствами, индукция которых была также вызвана переносом морфогенетически активных лимфоцитов селезенки [1]. Не исключено, что этот эффект может быть связан с наступающей к этому сроку элиминацией индукционных (регенерационных) факторов из организма здоровых крыс-реципиентов.

Появление выраженной пролиферативной и митотической активности у гепатоцитов в печени крыс-реципиентов группы 2 и отсутствие аналогичного эффекта в печени крыс-реципиентов после введения им активированных ККМ (группа 1), по-видимому, можно связать с существующей в организме клеточной специализацией, в том числе и при формировании регенерационного процесса, в котором клетки костного мозга – центрального органа иммуногенеза – выполняют роль аккумулятора и преобразователя регенерационных сигналов, поступающих из очага повреждения, а исполнителями этого процесса уже выступают зрелые активно мигрирующие информированные лимфоциты периферической иммунной системы – лимфоциты из лимфоузлов и селезенки, но не моноклеарные ККМ [1]. В роли молекул,

обеспечивающих информационный обмен, выступают различные типы РНК, которые доставляются в очаг повреждения с помощью лимфоцитов [3, 13, 14]. Индукция митотической и пролиферативной активности именно гепатоцитов в печени неопериро-

Рис. 2. Гистологические препараты печени здоровой крысы через 48 часов: а – после введения физраствора (контроль); б – после введения общей РНК из моноклеарных клеток костного мозга крысы с 70–75% гепатэктомией, молодые гепатоциты в периферических зонах печеночной долики (указаны стрелками). Гематоксилин и эозин, $\times 100$

Fig. 2. Histological specimens of the healthy rat liver in 48 hours: а – after infusion of saline solution (control); б – after infusion of the total RNA from the bone marrow mononuclear cells of rats with 70–75% hepatectomy, numerous young hepatocytes in peripheral zones of the hepatic lobule (indicated by arrows). Hematoxylin – eosin, $\times 100$

Рис. 3. Гистологические препараты экспрессии Ki 67 в печени здоровой крысы через 48 часов: а – после введения физраствора (контроль); б – после введения РНК из мононуклеарных клеток костного мозга крысы с 70–75% гепатэктомией. Иммуногистохимическое исследование. Многочисленные позитивно окрашенные гепатоциты (указаны стрелками). $\times 400$

Fig. 3. Histological specimens of Ki 67 expression in the healthy rat liver in 48 hours: а – after infusion of saline solution (control); б – after infusion of the total RNA from the bone marrow mononuclear cells of rats with 70–75% hepatectomy. Immunohistochemical test. Numerous positive painted hepatocytes (indicated by arrows). $\times 400$

ванных реципиентов после введения им общей РНК из активированных мононуклеарных ККМ крыс с 70–75% гепатэктомией указывает на тот факт, что активированные ККМ не только воспринимают, аккумулируют и формируют тканеспецифические регенерационные сигналы, но и способны реализовать их адресную доставку с помощью общей РНК, после выделения ее из этих клеток.

Отсутствие достоверных изменений в митотической активности клеток канальцевого эпителия почек у крыс-реципиентов в исследованных группах на всех сроках подтверждает, что перенос регене-

рационных сигналов, аккумулированных в общей РНК из активированных мононуклеарных ККМ от крыс-доноров с резекцией печени, является адресным тканезависимым механизмом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общая РНК, выделенная из активированных гепатэктомией мононуклеарных клеток костного мозга, аккумулирует и адресно переносит регенерационные (пролиферативные) сигналы именно в ткань печени после моделирования частичной гепатэктомии.

Активированные мононуклеарные клетки костного мозга напрямую не индуцируют и не переносят регенерационные сигналы в ткань печени после моделирования гепатэктомии.

Общая РНК, выделенная из мононуклеарной фракции клеток костного мозга, может быть использована для непосредственной регуляции регенерационных процессов в печени и других органах.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бабаева АГ, Геворкян НМ, Зотиков ЕА. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: Изд. РАМН, 2009: 107. *Babaeva AG, Gevorkyan NM, Zotikov EA. Rol' limfocitov v operativnom izmenenii programmy' razvitiya tkanej. M.: Izd. RAMN, 2009: 107.*
2. Бабаева АГ, Тишевская НВ, Геворкян НМ. О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах // Рос. акад. наук, Науч.-исслед. ин-т морфологии человека. М., 2016: 272. *Babaeva AG, Tishevskaya NV, Gevorkyan NM. O morfogeneticheskikh svojstvakh RNK limfoidnyh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nyh processah // Ros. akad. nauk, Nauch.-issled. in-t morfologii cheloveka. M., 2016: 272.*
3. Тишевская НВ, Бабаева АГ, Геворкян НМ. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 2016; 102 (11): 1280–1301. *Tishevskaya NV, Babaeva AG, Gevorkyan NM. Rol' limfocitarnykh RNK v mezhkлетochnom informacionnom obmene i regulyacii regenerativnykh processov. Ros. fiziol. zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2016; 102 (11): 1280–1301.
4. Gregorini M, Bosio F, Rocca C, Corradetti V et al. Mesenchymal stromal cells reset the scatter factor system and cytokine network in experimental kidney transplantation. *BMC Immunol.* 2014 Oct 3; 15: 44. DOI: 10.1186/s12865-014-0044-1.
5. Kaibori M, Adachi Y, Shimo T, Ishizaki M et al. Stimulation of liver regeneration after hepatectomy in mice by injection of bone marrow mesenchymal stem cells via the

- portal vein. *Transplant. Proc.* 2012 May; 44 (4): 1107–1109. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.01.088.0044-1.
6. Kantarcioğlu M, Demirci H, Avcu F, Karşioğlu Y et al. Efficacy of autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with liver cirrhosis. *Turk. J. Gastroenterol.* 2015 May; 26 (3): 244–250. DOI: 10.5152/tjg.2015.0074.
 7. Reis LA, Borges FT, Simões MJ, Borges AA et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e44092. DOI: 10.1371/journal.pone.0044092. Epub 2012 Sep 6.
 8. Wan Z, You S, Rong Y, Zhu B, Zhang A et al. CD34+ hematopoietic stem cells mobilization, paralleled with multiple cytokines elevated in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure. *Dig. Dis. Sci.* 2013 Feb; 58 (2):448–457. DOI: 10.1007/s10620-012-2458-z. Epub 2012 Oct 25.
 9. Бойко НВ, Голиков АЮ, Тарасов ВА, Матишов ДГ. Роль микро-РНК в регуляции активности генов у эукариот. *Вестник южного научного центра РАН.* 2011; 7 (3): 69–78. Bojko NV, Golikov AY, Tarasov VA, Matishov DG. Rol' mikro-RNK v regulyácii aktivnosti genov u eukariot. *Vestnik yuzhnogo nauchnogo centra RAN.* 2011; 7 (3): 69–78.
 10. Prasanth KV, Spector DL. Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the genome complexity conundrum. *Genes and Development.* 2007; 21: 11–42.
 11. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are: conserved targets of micro-RNAs. *Genome Res.* 2009 Jan; 19 (1): 92–105. DOI: 10.1101/gr.082701.108. Epub 2008 Oct 27.
 12. He L, Hannon GJ. Micro-RNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 2004 Jul; 5 (7): 522–531.
 13. Тишевская НВ, Геворкян НМ, Бабаева АГ, Захаров ЮМ и др. Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоз при экспериментальной полицитемии. *Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 2015; 101 (4): 451–461. Tishevskaya NV, Gevorkyan NM, Babaeva AG, Zaharov YuM i dr. Vliyanie summarnoj RNK limfoidnyh kletok selezenki na ehritropoezh pri ehksperimental'noj policitemii. *Rossijskij fiziol. zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2015; 101 (4): 451–461.
 14. Бабаева АГ, Геворкян НМ, Тишевская НВ, Головкина ЛЛ и др. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология.* 2015; 2 (10): 58–626. Babaeva AG, Gevorkyan NM, Tishevskaya NV, Golovkina LL i dr. O gemopoehticheskikh svojstvah ribonukleinovoj kisloty limfocitov perifericheskoy krovi bol'nyh istinnoj policitemiej i zdorovyh donorov. *Onkogematologiya.* 2015; 2 (10): 58–626.
 15. Ельчанинов АВ, Фатхудинов ТХ, Усман НЮ и др. Экспрессия генов цитокинов и факторов роста в печени после субтотальной резекции у крыс. *Гены и клетки.* 2016; 11 (1): 61–67. El'chaninov AV, Fathudinov TH, Usman NYu i dr. Ehkspressiya genov citokinov i faktorov rosta v pecheni posle subtotal'noj rezekcii u krys. *Geny i kletki.* 2016; 11 (1): 61–67.

Статья поступила в редакцию 7.06.2018 г.
The article was submitted to the journal on 7.06.2018