

ОЦЕНКА ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ РЕАКЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК НА ГАММА-ОБЛУЧЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Н. И. Атаманюк¹ ✉, Е. А. Пряхин¹, Е. В. Стяжкина^{1,2}, Н. А. Обвинцева¹, Г. А. Тряпицына^{1,2}, А. А. Перетыкин¹, С. С. Андреев¹, А. Е. Алдибекова¹, А. В. Аклев^{1,2}¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, Россия² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

Оценка персонафицированной реакции клеток, тканей и организма на радиационное воздействие является важной проблемой радиобиологии и радиационной защиты. Целью исследования было разработать метод оценки персонафицированной реакции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека в модели гуманизированных мышей. ГСК пуповинной или периферической крови вводили иммунодефицитным мышам NOD SCID. После острого внешнего гамма-облучения в дозах 0,5 Гр, 1 Гр и 1,5 Гр оценивали число ГСК (CD34⁺-клеток), созревающих и зрелых лейкоцитарных клеток CD45⁺, долю ГСК среди всех CD45^{low/+}-клеток через трое суток (период максимальной гибели) и 14 суток (период активного восстановления) после облучения. Методом регрессионного анализа рассчитывали зависимость показателей от дозы облучения. Описана экспоненциальная зависимость выживаемости ГСК человека у гуманизированных мышей через трое суток после облучения ($R^2 = 0,93$; $F = 211$; $p < 0,01$), линейная зависимость от дозы количества ГСК на 14-е сутки после облучения ($R^2 = 0,65$; $F = 12,9$; $p = 0,01$). В качестве показателя, отражающего гибель ГСК и восстановление их числа и функциональной активности, предложен коэффициент $K_{14/3}$, равный отношению доли ГСК среди всех CD45^{low/+}-клеток человека на 14-е сутки после облучения к этому параметру на третьи сутки. $K_{14/3}$ имел обратную зависимость от дозы облучения ($R^2 = 0,57$; $F = 13,3$; $p = 0,004$), был выше у радиорезистентных мышей и в модели индуцированной цистеамином радиорезистентности у гуманизированных мышей. Модель мышей, гуманизированных ГСК периферической крови, может быть использована для оценки персонафицированных реакций ГСК на острое внешнее гамма-облучение на основе применения показателя $K_{14/3}$, данных о выживаемости и восстановлении ГСК.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, острый радиационный синдром, гуманизированные мыши, индивидуальная радиочувствительность**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России.**Благодарности:** авторы благодарят А. В. Шерстобитова (ГБУЗ «Областной перинатальный центр» г. Челябинска) за помощь в организации и отбор проб пуповинной крови.**Вклад авторов:** Н. И. Атаманюк — планирование и проведение экспериментов, написание статьи; Е. А. Пряхин — планирование и руководство работой, написание статьи; Е. В. Стяжкина — выделение ГСК, анализ данных; Н. А. Обвинцева — выполнение измерений, проточная цитометрия; Г. А. Тряпицына — анализ данных; А. А. Перетыкин — облучение животных, дозиметрические исследования; С. С. Андреев — манипуляции с животными, измерения; А. Е. Алдибекова — манипуляции с животными; А. В. Аклев — общее руководство.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ (протокол № 2 от 27 июня 2022 г.). Пробы пуповинной крови отбирали в ГБУЗ «Областной перинатальный центр», периферической крови — ГБУЗ «Станция переливания крови» ФМБА России в г. Челябинск в соответствии с Постановлением Правительства РФ № 331. Работа с животными выполнена с учетом Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986 г., Страсбург), Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.✉ Для корреспонденции: Наталья Игоревна Атаманюк
ул. Воровского, д. 68 А, г. Челябинск, 454141, Россия; vita_pulhura@mail.ru**Статья получена:** 22.02.2023 **Статья принята к печати:** 09.03.2023 **Опубликована онлайн:** 11.03.2023**DOI:** 10.47183/mes.2023.006

ASSESSMENT OF INDIVIDUAL HEMATOPOIETIC STEM CELL RESPONSE TO GAMMA EXPOSURE USING HUMANIZED MICE

Atamanyuk NI¹ ✉, Pryakhin EA¹, Styazhkina EV^{1,2}, Obvintseva NA¹, Tryapitsyna GA^{1,2}, Peretykin AA¹, Andreev SS¹, Aldibekova AE¹, Akleyev AV^{1,2}¹ Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Chelyabinsk, Russia² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Assessment of individual responses of cells, tissues and the whole body to radiation exposure is an important challenge for radiobiology and radiation safety. The study was aimed to develop the method for estimation of the human hematopoietic stem cell (HSC) individual response in the humanized mouse model. The cord blood or peripheral blood HSCs were administered to the NOD SCID immunodeficient mice. The number of maturing HSCs (CD34⁺ cells) and mature CD45⁺ leukocytes was assessed after the acute gamma exposure to the doses of 0.5 Gy, 1 Gy, and 1.5 Gy, along with the HSC share among all CD45^{low/+} cells within three days (period of maximum mortality) and 14 days (period of active restoration) after exposure. The relationship between the indicator values and the exposure dose was calculated by regression analysis. There was exponential relationship between the human HSC survival rate in humanized mice and the dose on day three after exposure ($R^2 = 0.93$; $F = 211$; $p < 0.01$), while the relationship between the number of HSCs and the dose on day 14 after exposure was linear ($R^2 = 0.65$; $F = 12.9$; $p = 0.01$). The $C_{14/3}$ coefficient calculated as a ratio of the HSC share among all human CD45^{low/+} cells on day 14 after exposure to the same parameter on day three after exposure was proposed as an indicator of HSC mortality and HSC number restoration. $C_{14/3}$ negatively correlated with the exposure dose ($R^2 = 0.57$; $F = 13.3$; $p = 0.004$), it was higher in radioresistant mice and the model of cysteamine-induced radioresistance in humanized mice. The model mice humanized using the peripheral blood HSCs can be used to assess individual HSC response to acute external gamma exposure based on $C_{14/3}$ and the data on the HSC survival and restoration.

Keywords: hematopoietic stem cells, acute radiation syndrome, humanized mice, individual radiosensitivity**Funding:** the study was performed as part of the State Assignment of FMBA of Russia.**Acknowledgments:** the authors would like to thank A.V. Sherstobitov (Regional Perinatal Center, Chelyabinsk) for his help in organizing and cord blood sampling.**Author contribution:** Atamanyuk NI — planning and conducting experiments, manuscript writing; Pryakhin EA — study planning and management, manuscript writing; Styazhkina EV — HSC isolation, data analysis; Obvintseva NA — measurement, flow cytometry; Tryapitsyna GA — data analysis; Peretykin AA — animal exposure, dosimetry studies; Andreev SS — animal handling, measurement; Aldibekova AE — animal handling; Akleyev AV — general management.**Compliance with the ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Urals Research Center for Radiation Medicine (protocol № 2 of 27 June 2022). Cord blood sampling was performed after obtaining the informed consent from donors at the Chelyabinsk Regional Perinatal Center. Peripheral blood samples were provided by the Blood Transfusion Station of FMBA of Russia (Chelyabinsk) in accordance with the Decree of the Government of the Russian Federation № 331 of 12 April 2013. Animals were handled in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (1986, Strasbourg), Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.✉ Correspondence should be addressed: Natalia I. Atamanyuk
Vorovskogo, 68A, Chelyabinsk, 454141, Russia; vita_pulhura@mail.ru**Received:** 22.02.2023 **Accepted:** 09.03.2023 **Published online:** 11.03.2023**DOI:** 10.47183/mes.2023.006

Разработка подходов к оценке индивидуальной радиочувствительности остается актуальным направлением радиационной биологии человека в связи с интенсивным развитием атомных технологий, технологий ядерной медицины, перспективами длительных межпланетных космических полетов [1, 2]. Оценка персонифицированной реакции на облучение необходима для выявления групп повышенного риска в отношении эффектов облучения, что целесообразно как при отборе персонала для работ с источниками ионизирующего излучения, космонавтов, так и для персонификации радиационного риска медицинских эффектов облучения человека.

Явление радиочувствительности исследователи рассматривают на разных уровнях, от радиочувствительности целого организма, проявляющейся в выживаемости или гибели после облучения, до радиочувствительности тканей и клеток и их склонности к развитию неблагоприятных отдаленных последствий облучения [1–3]. При этом нет единой системы определения индивидуальной радиочувствительности человека. Идут интенсивные исследования по изучению молекулярно-генетических, иммунологических, гематологических и других маркеров — персонализированных предикторов тканевых реакций и отдаленных последствий как острого, так и хронического радиационного воздействия [1, 2, 4, 5].

Красный костный мозг является одной из наиболее радиочувствительных тканей организма человека. Устойчивость костного мозга к облучению определяется репарацией повреждений ДНК, репопуляцией клеток ткани за счет выживших пролиферирующих клеток, способностью ткани формировать функциональный резерв клеток и др. [1]. Для костномозговой формы острого лучевого синдрома последствия для организма (вероятность гибели) существенным образом обусловлены выживаемостью гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и кинетикой выживших клеточных популяций [6, 7]. Ионизирующее излучение оказывает подавляющее воздействие на пролиферативный и восстановительный потенциал ГСК. При этом не решен вопрос о связи реакции ГСК на облучение с индивидуальной радиочувствительностью.

Для оценки персонифицированной реакции ГСК человека на ионизирующее излучение перспективно применение гуманизированных мышей [8, 9]. На модели гуманизированных путем пересадки ГСК человека мышей описаны такие реакции ГСК на облучение, как увеличение фокусов γ H2AX, увеличение экспрессии гена *p16INK4a*, потеря способности ГСК к репопуляции после пересадки вторичным реципиентам и сокращение репертуара дифференцировки [10]. Схожие процессы характерны для естественного старения ГСК [11–13], а также отмечаются при внешнем облучении человека и животных [14], в частности отмечается явление клональной экспансии гемопоэтических клеток у облученных животных [15], у астронавтов, получивших повышенное облучение в ходе космических полетов [16].

Вышесказанное определяет актуальность и обоснованность постановки такой задачи, как разработка способов оценки персонифицированной реакции ГСК на облучение и ее связи с радиочувствительностью.

Цель исследования — разработать технологию оценки персонифицированной реакции ГСК человека на облучение на основе их ксенотрансплантации иммунодефицитным мышам для определения радиочувствительности с точки зрения тканевых реакций системы кроветворения на острое облучение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения гуманизированных мышей использовали иммунодефицитных мышей линии NOD SCID (питомник SPF-вивария ИЦиГ СО РАН; Новосибирск, Россия). Животных содержали в SPF-условиях при температуре воздуха 22 ± 2 °C и влажности 50–60% на гранулированном автоклавируемом корме SPF-категории для мышей категории «разведение», без ограничения подачи корма и питьевой воды, при 12-часовом световом дне. Для выведения из эксперимента применяли метод дислокации шейных позвонков.

Животным вводили ГСК из периферической и пуповинной крови [17]. ГСК получали из проб пуповинной крови, отобранных в ГБУЗ Областной перинатальный центр, а также из продукта периферической донорской крови — лейкотромбослоя (ГБУЗ Станция переливания крови ФМБА России; Челябинск, Россия). ГСК выделяли из крови методом интумесцентной сепарации с помощью набора EasySep Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit II (Stem Cell Technologies; Канада). ГСК идентифицировали как CD45_{ow}CD34⁺-клетки.

Мышам осуществляли инъекцию ГСК пуповинной крови внутривенно в боковую хвостовую вену после предварительного острого внешнего гамма-облучения в дозе 2,5 Гр. В течение девяти недель происходило приживание ГСК в костном мозге мыши и формирование человеческого лимфогранулопоэза. ГСК, полученные от каждого донора пуповинной крови, вводили в равном количестве не менее чем трем мышам (число вводимых ГСК составляло 30–200 тыс. клеток на каждое животное). Одна мышь оставалась контрольной, а двух других вновь облучали через девять недель после трансплантации ГСК в дозах 0,5, 1,0 и 1,5 Гр (по три донора ГСК на каждую дозу). Измеряли число клеток человека и мыши в костном мозге бедренной кости контрольной мыши и у мышей через трое суток и 14 суток после облучения.

ГСК, полученные из периферической крови, вводили внутрикостно в большую берцовую кость мышам после изофлуранового наркоза. ГСК, полученные от каждого донора периферической крови, вводили в равном количестве не менее чем четырем мышам (число вводимых ГСК составляло 30–115 тыс. клеток на каждое животное). При этом двух особей, получивших клетки от одного донора, облучали до введения ГСК (клетки человека необлученные), а двух мышей, получивших клетки от того же донора, облучали после введения ГСК (человеческие клетки облучены). Облучение проводили в тех же дозах — 0,5, 1,0 и 1,5 Гр (по три донора на каждую дозу). Измеряли содержание клеток человека и мыши через трое суток и 14 суток после облучения (для каждого срока — одна мышь с необлученными ГСК человека и одна — с получившими облучение клетками).

Облучение проводили на исследовательской радиобиологической гамма-установке ИГУР-1М («Квант»; Россия). Установка оснащена ^{137}Cs -источниками, мощность дозы составляет 0,91 Гр/мин, неравномерность гамма-поля не более 10%.

Методом проточной цитометрии в костном мозге мышей измеряли число мышинных CD45⁺-клеток (окраска моноклональными крысиными антителами антиCD45-PE, клон 30-F11; BD Pharmingen, США), человеческих лейкоцитарных CD45⁺-клеток (окраска моноклональными мышинными антителами антиCD45-FITC, клон HI30; Stem Cell Technologies, Канада) и человеческих стволовых

CD45^{low}CD34⁺-клеток (окраска моноклональными мышиными антителами антиCD34-APC, клон 581; Stem Cell Technologies, Канада). Измерения проводили на цитометре Accuri C6 (BD Biosciences; США), рассчитывали число клеток в миллилитрах суспензии, содержащей клетки из одной кости.

Рассчитывали выживаемость облученных клеток как отношение числа облученных клеток через трое и 14 суток к числу клеток того же донора у контрольной необлученной мыши для ГСК пуповинной крови, как отношение числа облученных клеток к числу необлученных клеток того же донора в тот же срок после облучения для ГСК периферической крови. Рассчитывали процентное содержание ГСК от общего количества всех CD45^{low}/CD45⁺-клеток человека для каждого гуманизированного животного. Также определяли коэффициент, равный отношению доли ГСК на 14-е сутки после облучения к доле ГСК на третьи сутки после облучения ($K_{14/3}$), так как ранее этот показатель продемонстрировал связь с выживаемостью животных и репопуляцией клеток в костном мозге у негуманизированных мышей *in vivo* [18].

Для оценки прогностических свойств коэффициента $K_{14/3}$ с целью определения персонализированной реакции ГСК человека на радиационное воздействие и связь этого показателя с радиочувствительностью проводили два эксперимента. В первом эксперименте измеряли коэффициент $K_{14/3}$ для доли стволовых кроветворных CD117⁺-клеток мышей после облучения в дозе 1 Гр у животных двух линий, отличающихся радиочувствительностью: радиочувствительной линии NOD SCID ($LD_{50/30} = 3,5$ Гр) и относительно радиорезистентной линии C57Bl/6 ($LD_{50/30} = 6,0$ Гр) [18].

Во втором эксперименте ГСК, полученные от трех доноров пуповинной крови, использовали для гуманизации не трех, а пяти гуманизированных мышей. Этим трем дополнительным гуманизированным особям за 30 мин до облучения вводили внутривенно препарат с известным радиозащитным действием — 2-меркаптоэтиламин (цистеамин) в дозе 200 мг/кг массы тела (Serva; США). Животных от двух доноров облучали в дозе 0,5 Гр, а от третьего донора — в дозе 1 Гр. Сравнивали коэффициент $K_{14/3}$ у гуманизированных мышей без цистеамина и у мышей с повышенной за счет цистеамина радиорезистентностью.

Для исследуемых показателей рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку. Проводили регрессионный анализ для выявления зависимости исследуемых показателей от дозы с помощью

программного пакета Microsoft Office Excel (Microsoft; США). Коэффициенты уравнений в моделях регрессии сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Результаты принимали статистически значимыми при вероятности нулевой гипотезы ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При введении ГСК пуповинной крови мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (NOD SCID) клетки человека заселяют костный мозг мышей и формируют у них пул самоподдерживающихся стволовых гемопоэтических клеток, а также пул созревающих клеток преимущественно лимфогранулоцитарного ряда [17, 19]. Такая модель позволяет изучать радиационно-индуцированную гибель и репопуляцию стволовых клеток человека и их потенциал к поддержанию пула созревающих клеток человека *in vivo* в модели гуманизированных животных.

В наших экспериментах было выявлено, что облучение гуманизированных мышей приводит к дозозависимому снижению выживаемости CD45^{low}CD34⁺-клеток человека через трое суток после облучения (рис. 1А), зависимость от дозы имеет экспоненциальный характер ($R^2 = 0,67$; $F = 38,65$; $p < 0,001$).

На 14-е сутки после облучения число ГСК у облученных мышей увеличивалось и могло у разных доноров превышать исходный контрольный уровень без облучения или не достигать его (рис. 1Б). Статистически значимой зависимости от дозы для снижения числа ГСК на 14-е сутки после облучения в зависимости от дозы облучения получено не было ($R^2 = 0,34$; $F = 4,01$; $p = 0,079$ для линейной зависимости).

После облучения снизилась доля стволовых клеток среди всех клеток человека в костном мозге гуманизированных мышей по сравнению с исходным уровнем $25 \pm 8\%$. Линейную зависимость от дозы в диапазоне 0,5–1,5 Гр имел коэффициент $K_{14/3}$, равный отношению доли стволовых клеток на 14-е сутки после облучения к доле стволовых клеток на третьи сутки после облучения (рис. 2). С увеличением дозы этот показатель снижался ($R^2 = 0,57$; $F = 13,26$; $p = 0,004$). Данный показатель отражает выживаемость стволовых клеток, их восстановление через 14 суток после облучения и их возможность продуцировать дифференцирующиеся клетки.

В эксперименте с применением радиозащитного препарата цистеамина было показано, что у защищенных с помощью радиопротектора гуманизированных мышей

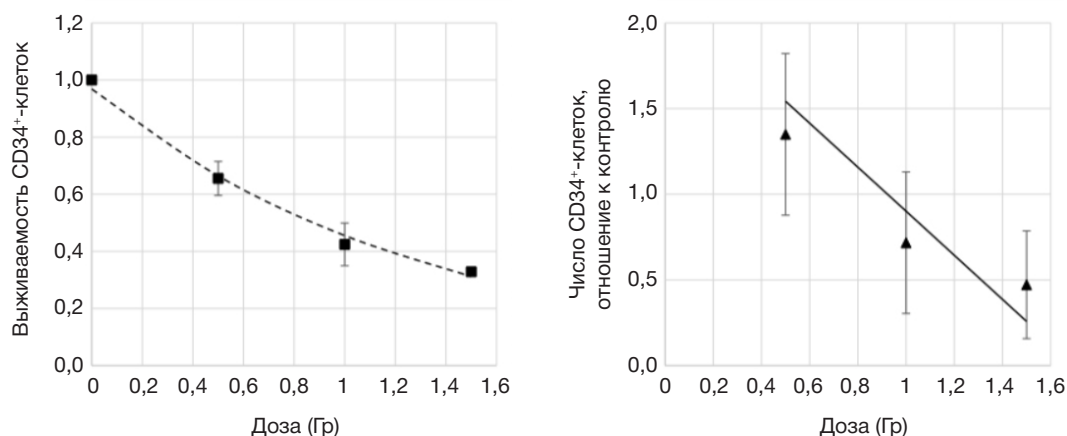


Рис. 1. Выживаемость CD45^{low}CD34⁺-клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК пуповинной крови, в зависимости от дозы острого внешнего гамма-облучения. А. Выживаемость ГСК через трое суток после облучения. Б. Число ГСК по отношению к необлученному контролю через 14 суток после облучения

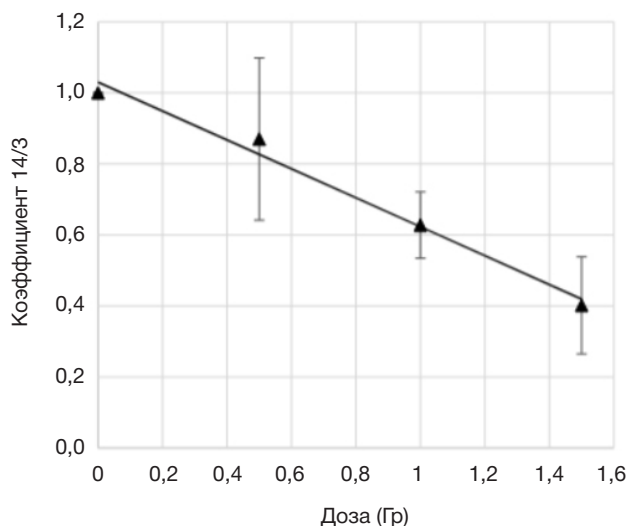


Рис. 2. Зависимость от дозы коэффициента $K_{14/3}$ для $CD45^{low}CD34^{+}$ -клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК пуповинной крови

коэффициент $K_{14/3}$ был выше, чем у незащищенных, облученных в той же дозе (рис. 3). Таким образом, повышение коэффициента свидетельствует о более высокой радиорезистентности.

Аналогичная закономерность выявлена при сравнении коэффициента $K_{14/3}$ у мышей разных линий, различающихся по радиочувствительности (рис. 4). Так, у радиочувствительных мышей NOD SCID ($LD_{50/30} = 3,5$ Гр, 95%-й ДИ — 3,4–3,8 Гр) $K_{14/3}$ при облучении в дозе 1 Гр составил $0,23 \pm 0,06$, что статистически значимо ($t = 3,9$; $p = 0,003$) отличалось от значения показателя $K_{14/3}$ ($0,98 \pm 0,18$) у мышей C57Bl/6 с нормальной радиочувствительностью ($LD_{50/30} = 6,0$ Гр, 95%-й ДИ — 5,8–6,2 Гр), что подтверждает способность коэффициента отражать различия реакции гемопоэза у мышей с разной радиочувствительностью *in vivo*.

При введении ГСК периферической крови взрослых людей ГСК не способны длительно функционировать в костном мозге мышей, но способны сохранять свой пул и продуцировать созревающие клетки не менее 14 суток [17]. При этом так же, как и в модели гуманизированных ГСК пуповинной крови мышей, выявляется экспоненциальная зависимость выживаемости ГСК человека от дозы внешнего гамма-облучения на третьи сутки после облучения ($R^2 = 0,93$; $F = 211$; $p < 0,001$; рис. 5А).

На 14-е сутки после облучения число ГСК увеличивалось и превышало контрольный уровень без облучения при облучении в дозе 0,5 Гр; при облучении в дозах 1,0 и 1,5 Гр число клеток оставалось сниженным по сравнению с числом ГСК на 14-е сутки без облучения (рис. 5Б). Описана модель линейной зависимости от дозы количества ГСК по отношению к необлученному контролю через 14 суток после облучения ($R^2 = 0,65$; $F = 12,90$; $p = 0,009$).

Важно отметить, что модели, описывающие зависимость выживаемости клеток от дозы, полученные для ГСК пуповинной и периферической крови, не различались: нет статистически значимых различий при сравнении коэффициентов ($t = 1,18$; $p = 0,24$) и свободного члена ($t = 0,15$; $p = 0,88$) в уравнениях зависимости выживаемости ГСК от дозы на третьи сутки после облучения; при сравнении угла наклона ($t = 0,19$; $p = 0,85$) и свободного члена ($t = 0,34$; $p = 0,74$) в уравнениях зависимости относительного числа клеток от дозы на 14-е сутки после облучения.

Коэффициент $K_{14/3}$ в краткосрочной модели гуманизации мышей ГСК периферической крови также, как и в модели гуманизированных ГСК пуповинной крови мышей, зависел от дозы ($R^2 = 0,45$; $F = 5,67$; $p = 0,048$) и отражал индивидуальные особенности ГСК доноров (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка индивидуальной радиочувствительности как с точки зрения тяжести ранних тканевых реакций, так и с точки зрения риска развития отдаленных последствий облучения необходима для выявления групп повышенного риска в отношении неблагоприятных эффектов облучения (в случае повышенной радиочувствительности) и подбора персонала (лица с повышенной радиорезистентностью).

Индивидуальные реакции на облучение могут быть измерены на разных уровнях организации организма на основе оценки различных конечных эффектов облучения, включая гибель организма, рак, неопластические заболевания, тканевые реакции после облучения, хромосомные повреждения и молекулярные изменения [2, 3]. Не во всех работах удается выявить связь между молекулярными и клеточными реакциями *in vitro* и тяжестью тканевых реакций на острое облучение [4, 20, 21].

Хорошим предиктором радиочувствительности, по-видимому, можно считать клоногенное выживание клеток [4]. Для оценки радиочувствительности кроветворной

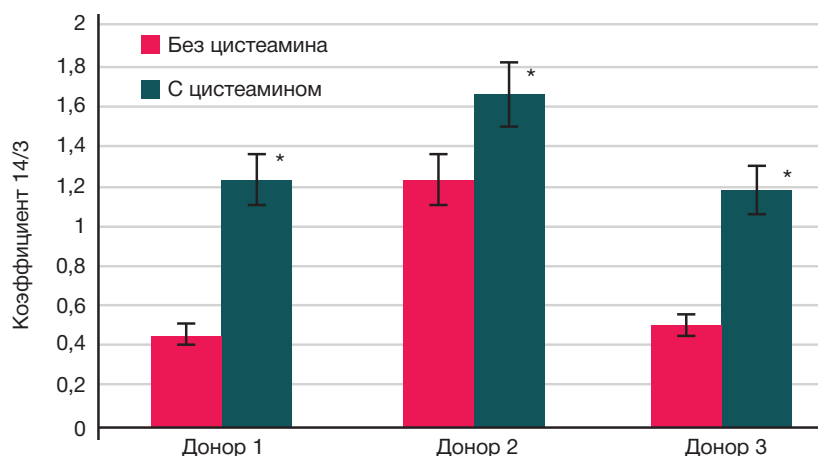


Рис. 3. Коэффициент $K_{14/3}$ для $CD45^{low}CD34^{+}$ -клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК пуповинной крови трех доноров. Результаты реакции кроветворных клеток человека у гуманизированных мышей на облучение в группах с введением цистеаминa (индуцированная радиорезистентность) и без. * — статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$

системы в качестве репрезентативной модели можно рассматривать ГСК. Перспективным методом оценки персонализированной реакции ГСК может оказаться получение гуманизированных мышей [8, 9], которые могут быть рассмотрены как «аватары», отражающие весь комплекс особенностей реакции клеток, свойственных донору клеток. Такой подход разрабатывается в рамках внедрения персонализированной медицины для лечения онкологических пациентов, изучения индивидуальных иммунологических особенностей [22–25].

При трансплантации ГСК человека предварительно облученным в сублетальной дозе мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом человеческие клетки способны занимать опустевшие после облучения ниши в костном мозге животных и длительное время (2–12 месяцев после введения) существовать в организме мыши. При этом ГСК как поддерживают свой пул мультипотентных стволовых клеток, так и дают начало зрелым функционально активным клеткам крови, главным образом миелоидного ростка кроветворения.

Мыши, гуманизированные введением ГСК пуповинной крови, пригодны для моделирования острого радиационного синдрома, так как дают возможность оценить влияние облучения на гибель и последующую репопуляцию и функциональную активность ГСК. В настоящей работе показана зависимость от дозы при облучении в дозах от 0,5 до 1,5 Гр выживаемости ГСК в короткие сроки после облучения (через трое суток) и количества ГСК через 14 суток после облучения, в период восстановления их численности.

Предложенный авторами коэффициент $K_{14/3}$, характеризующий изменение доли ГСК относительно других $CD45^{low/+}$ -клеток человека за 14 суток после облучения, рассматривается как интегральный показатель, отражающий гибель и последующее восстановление, функциональную активность ГСК. В предыдущих работах была показана связь этого показателя с выживаемостью мышей разных линий, т. е. с радиочувствительностью на организменном уровне [18]. В модели гуманизированных ГСК пуповинной крови мышей показана обратная зависимость коэффициента $K_{14/3}$ от дозы облучения, что говорит о возможности использования этого показателя для оценки выраженности тканевой реакции на ионизирующее излучение. В экспериментах по сравнению данного показателя у организмов с заведомо разной радиочувствительностью (мыши NOD SCID и C57Bl/6, гуманизированные мыши с радиопротектором и без

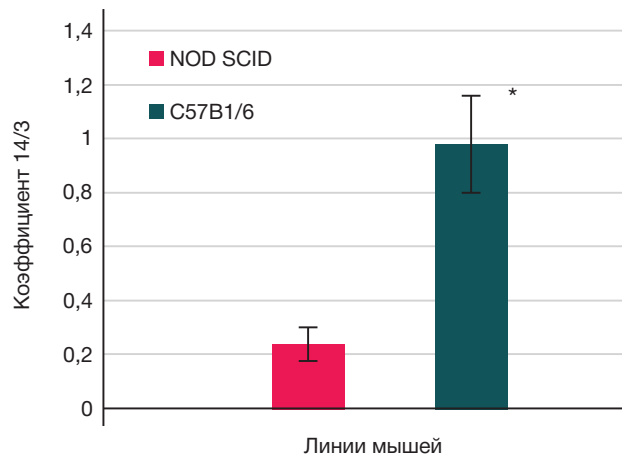


Рис. 4. Коэффициент $K_{14/3}$ для гемопоэтических $CD117^{+}$ -клеток мышей разных линий с высокой радиочувствительностью (NOD SCID) и нормальной радиочувствительностью (C57Bl/6). * — статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$

него) обнаружены однонаправленные различия: значения коэффициента были выше у более радиорезистентных объектов. Ассоциация более высокого значения $K_{14/3}$ с меньшими уровнями дозы и с более высокой радиорезистентностью может быть связана с более эффективной репопуляцией ГСК после облучения, более высоким пролиферативным потенциалом и более эффективным восстановлением пула стволовых клеток до того, как будут запущены процессы дифференцировки, созревания $CD45^{+}$ -клеток.

При введении иммунодефицитным мышам ГСК периферической крови не удается получить длительно сохраняющийся пул стволовых клеток в костном мозге животных [17], однако возможно применение схемы облучения одновременно с трансплантацией клеток человека и измерения числа ГСК и созревающих кроветворных клеток в течение 14 суток после трансплантации. В работе показано, что дозовая зависимость выживаемости ГСК через трое суток после облучения и их количества через 14 суток после облучения не отличается в моделях гуманизированных мышей с длительно сохраняющимися ГСК пуповинной крови и ГСК периферической крови. Следовательно, не предполагающая длительной репопуляции стволовых клеток модель с использованием ГСК периферической крови также приемлема для моделирования острого лучевого синдрома и оценки радиационно-индуцированной гибели и восстановления

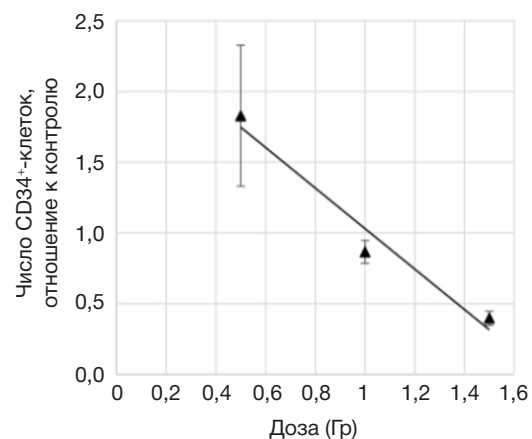
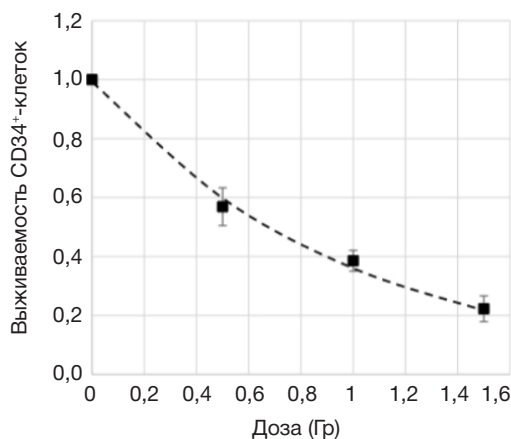


Рис. 5. Выживаемость $CD45^{low}CD34^{+}$ -клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК периферической крови, в зависимости от дозы острого внешнего гамма-облучения. А. Выживаемость ГСК через трое суток после облучения. Б. Количество ГСК по отношению к необлученному контролю через 14 суток после облучения

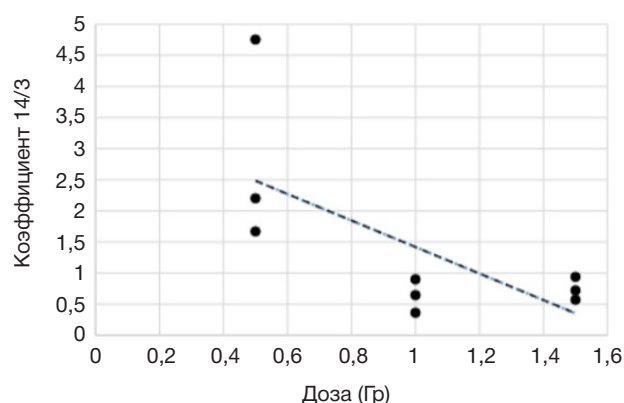


Рис. 6. Зависимость от дозы коэффициента $K_{14/3}$ для $CD45^{low}CD34^{+}$ -клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК периферической крови взрослых людей

клеток. В модели с использованием ГСК периферической крови рассчитанный коэффициент $K_{14/3}$ тоже показал обратную зависимость от дозы.

Важно обратить внимание на тот факт, что выживаемость ГСК на третьи сутки после облучения у разных доноров как пуповинной, так и периферической крови, имела гораздо меньшие индивидуальные отличия, чем возросшее через 14 суток число ГСК, а также число созревающих $CD45^{+}$ -клеток и, соответственно, относительная доля ГСК среди всех человеческих клеток и коэффициент $K_{14/3}$.

Очевидно, что индивидуальные особенности в меньшей степени влияют на различия радиационно-индуцированной гибели клеток, а в большей — на возможности репарации и последующего восстановления пула стволовых клеток, клоногенную активность ГСК.

Наиболее выраженные индивидуальные отличия были зарегистрированы при облучении гуманизированных мышей в дозе 0,5 Гр. Этот уровень воздействия может быть рекомендован для оценки персонализированных реакций ГСК, отражающих индивидуальную радиочувствительность, в модели гуманизированных мышей с использованием ГСК периферической крови.

ВЫВОДЫ

Модель гуманизированных ГСК человека, выделенных из пуповинной и периферической крови, может быть использована для изучения реакции ГСК на облучение *in vivo*. Наиболее эффективным, интегральным показателем, отражающим радиационно-индуцированную гибель ГСК, восстановление их числа и функциональную активность, является коэффициент $K_{14/3}$, равный отношению доли ГСК среди всех $CD45^{low/+}$ -клеток человека на 14-е сутки после облучения к этому параметру на третьи сутки после облучения. Этот коэффициент может быть использован для оценки персонализированной реакции ГСК человека на облучение.

Литература

- Хаитов Р. М., Аклев А. В., Кофиади И. А. Индивидуальная радиочувствительность и иммунитет: национальное руководство. Челябинск: Книга, 2018; 216 с.
- Applegate KE, Rühm W, Wojcik A, Bourguignon M, Brenner A, Hamasaki K, et al Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection. *Radiat Environ Biophys*. 2020; 59 (2): 185–209. DOI: 10.1007/s00411-020-00837-y. PMID: 32146555.
- Human Radiosensitivity. Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation Documents of the Health Protection Agency. London, 2013; 164 p.
- Ferlazzo ML, Bourguignon M, Foray N. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review. *Semin Radiat Oncol*. 2017; 27 (4): 310–5. DOI: 10.1016/j.semradonc.2017.04.003. PMID: 28865513.
- Когарко И. Н., Аклев А. В., Петушкова В. В., Нейфах Е. А., Когарко Б. С., Ктиторова О. В., и др. Адаптивный ответ как критерий оценки индивидуальной радиочувствительности человека. *Радиация и риск (Бюллетень НРЭР)*. 2022; 1. Доступно по ссылке: <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptivnyy-otvet-kak-kriteriy-otsenki-individualnoy-radiouchuvstvitelnosti-cheloveka-obzor> (дата обращения: 08.11.2022).
- Flidner TM, Graessle DH. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys*. 2008; 47: 63–69. DOI: org/10.1007/s00411-007-0148-6.
- Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20 (9): 1447–62. DOI:10.1089/ars.2013.5635.
- Fujiwara S. Humanized mice: a brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol*. 2018; 233: 2889–901.
- Ito R, Takahashi T, Ito M. Humanized mouse models: Application to human diseases. *J Cell Physiol*. 2018; 233 (5): 3723–8.
- Wang C, Oshima M, Sashida G, et al. Non-lethal ionizing radiation promotes aging-like phenotypic changes of human hematopoietic stem and progenitor cells in humanized mice. *PLoS ONE*. 2015; 10 (7): e0132041. DOI: org/10.1371/journal.pone.0132041.
- Zhang L, Mack R, Breslin P, Zhang J. Molecular and cellular mechanisms of aging in hematopoietic stem cells and their niches. *J Hematol Oncol*. 2020; 13 (1): 157. DOI: 10.1186/s13045-020-00994-z. PMID: 33228751; PMCID: PMC7686726.
- de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2018; 131 (5): 479–87. DOI: 10.1182/blood-2017-06-746412. PMID: 29141947.
- Meija-Ramirez E, Florian MC. Understanding intrinsic hematopoietic stem cell aging. *Haematologica*. 2020; 105 (1): 22–37. DOI: 10.3324/haematol.2018.211342. PMID: 31806687; PMCID: PMC6939535.
- Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20 (9): 1447–62. DOI: 10.1089/ars.2013.5635. PMID: 24124731; PMCID: PMC3936513.
- Yoshida K, Satoh Y, Uchimura A, Misumi M, Kyoizumi S, Taga M, et al. Massive expansion of multiple clones in the mouse hematopoietic system long after whole-body X-irradiation. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 17276. DOI: 10.1038/s41598-022-21621-6. PMID: 36241679; PMCID: PMC9568546.
- Brojakowska A, Kour A, Thel MC, et al. Retrospective analysis of somatic mutations and clonal hematopoiesis in astronauts. *Commun Biol*. 2022; 5: 828. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03777-z>.
- Атаманюк Н. И., Пряхин Е. А., Андреев С. С., Алдибекова А. Е., Тряпицына Г. А., Шапошникова И. А., и др. Использование ксенотрансплантации гемопоэтических клеток человека, выделенных из периферической крови взрослых людей и пуповинной крови, иммунодефицитным мышам для изучения действия ионизирующего излучения. *Вопросы радиационной безопасности*. 2021; 1: 72–83.
- Атаманюк Н. И., Стяжкина Е. В., Обвинцева Н. А., Тряпицына Г. А., Шапошникова И. А., Андреев С. С., и др. Кинетика гибели и восстановления клеток костного мозга у мышей двух линий с разной радиочувствительностью после острого γ -облучения.

- Вопросы радиационной безопасности. 2021; 4: 62–72.
19. Biancotti J-C, Town T. Increasing hematopoietic stem cell yield to develop mice with human immune systems. *BioMed Research International*. 2013; 11. DOI: 10.1155/2013/740892.
 20. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 2012; 88: 405–13.
 21. Kišonas J, Venius J, Sevriukova O, Grybauskas M, Dabkevičienė D, Burneckis A, et al. Individual Radiosensitivity as a Risk Factor for the Radiation-Induced Acute Radiodermatitis. *Life*. 2022; 12 (1): 20. Available from: <https://doi.org/10.3390/life12010020>.
 22. Yip H, Haupt C, Maresh G, Zhang X, Li L. Humanized mice for immune checkpoint blockade in human solid tumors. *Am J Clin Exp Urol*. 2019; 7 (5): 313–20. PMID: 31763362; PMCID: PMC6872471.
 23. Golebiewska A, Hau AC, Oudin A, Stieber D, Yabo YA, Baus V, et al. Patient-derived organoids and orthotopic xenografts of primary and recurrent gliomas represent relevant patient avatars for precision oncology. *Acta Neuropathol*. 2020; 140 (6): 919–49. DOI: 10.1007/s00401-020-02226-7. PMID: 33009951; PMCID: PMC7666297.
 24. Nilsson JA, Olofsson Bagge R, Ny L. Mouse avatars take off as cancer models. *Nature*. 2018; 562 (7726): 192. DOI: 10.1038/d41586-018-06982-1. PMID: 30305752.
 25. Rottstegge M, Tipton T, Oestereich L, Ruibal P, Nelson EV, Olal C, et al. Avatar Mice Underscore the Role of the T Cell-Dendritic Cell Crosstalk in Ebola Virus Disease and Reveal Mechanisms of Protection in Survivors. *J Virol*. 2022; 96 (18): e0057422. DOI: 10.1128/jvi.00574-22. PMID: 36073921; PM.
- ## References
1. Xaitov RM, Akleev AV, Kofiadi IA. Individual'naya radiochuvstvitel'nost' i immunitet: nacional'noe rukovodstvo. Chelyabinsk: Kniga; 2018; 216 s. Russian.
 2. Applegate KE, Rühm W, Wojcik A, Bourguignon M, Brenner A, Hamasaki K, et al Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection. *Radiat Environ Biophys*. 2020; 59 (2): 185–209. DOI: 10.1007/s00411-020-00837-y. PMID: 32146555.
 3. Human Radiosensitivity. Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation Documents of the Health Protection Agency. London, 2013; 164 p.
 4. Ferlazzo ML, Bourguignon M, Foray N. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review. *Semin Radiat Oncol*. 2017; 27 (4): 310–5. DOI: 10.1016/j.semradonc.2017.04.003. PMID: 28865513.
 5. Kogarko IN, Akleev AV, Petushkova VV, Nejfax EA, Kogarko BS, Kitorova OV, i dr. Adaptivnyj otvet kak kriterij ocenki individual'noj radiochuvstvitel'nosti cheloveka. *Radiaciya i risk (Byulleten' NREhR)*. 2022; 1. Dostupno po ssylke: <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptivnyy-otvet-kak-kriteriy-otsenki-individualnoy-radiochuvstvitel'nosti-cheloveka-obzor> (data obrashheniya: 08.11.2022). Russian.
 6. Flidner TM, Graessle DH. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys*. 2008; 47: 63–69. DOI: [org/10.1007/s00411-007-0148-6](https://doi.org/10.1007/s00411-007-0148-6).
 7. Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20 (9): 1447–62. DOI: 10.1089/ars.2013.5635.
 8. Fujiwara S. Humanized mice: a brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol*. 2018; 233: 2889–901.
 9. Ito R, Takahashi T, Ito M. Humanized mouse models: Application to human diseases. *J Cell Physiol*. 2018; 233 (5): 3723–8.
 10. Wang C, Oshima M, Sashida G, et al. Non-lethal ionizing radiation promotes aging-like phenotypic changes of human hematopoietic stem and progenitor cells in humanized mice. *PLoS ONE*. 2015; 10 (7): e0132041. DOI: [org/10.1371/journal.pone.0132041](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132041).
 11. Zhang L, Mack R, Breslin P, Zhang J. Molecular and cellular mechanisms of aging in hematopoietic stem cells and their niches. *J Hematol Oncol*. 2020; 13 (1): 157. DOI: 10.1186/s13045-020-00994-z. PMID: 33228751; PMCID: PMC7686726.
 12. de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2018; 131 (5): 479–87. DOI: 10.1182/blood-2017-06-746412. PMID: 29141947.
 13. Mejia-Ramirez E, Florian MC. Understanding intrinsic hematopoietic stem cell aging. *Haematologica*. 2020; 105 (1): 22–37. DOI: 10.3324/haematol.2018.211342. PMID: 31806687; PMCID: PMC6939535.
 14. Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20 (9): 1447–62. DOI: 10.1089/ars.2013.5635. PMID: 24124731; PMCID: PMC3936513.
 15. Yoshida K, Satoh Y, Uchimura A, Misumi M, Kyoizumi S, Taga M, et al. Massive expansion of multiple clones in the mouse hematopoietic system long after whole-body X-irradiation. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 17276. DOI: 10.1038/s41598-022-21621-6. PMID: 36241679; PMCID: PMC9568546.
 16. Brojakowska A, Kour A, Thel MC, et al. Retrospective analysis of somatic mutations and clonal hematopoiesis in astronauts. *Commun Biol*. 2022; 5: 828. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03777-z>.
 17. Atamanyuk NI, Pryaxin EA, Andreev SS, Aldibekova AE, Tryapicyna GA, Shaposhnikova IA, i dr. Ispol'zovanie ksenotransplantacii gemopoehticheskix kletok cheloveka, vydelennykh iz perifericheskoy krovi vzroslyx lyudej i pupovinnoy krovi, immunodeficitnym mysham dlya izucheniya dejstviya ioniziruyushhego izlucheniya. *Voprosy radiacionnoj bezopasnosti*. 2021; 1: 72–83. Russian.
 18. Atamanyuk NI, Styazhkina EV, Obvinceva NA, Tryapicyna GA, Shaposhnikova IA, Andreev SS, i dr. Kinetika gibeli i vosstanovleniya kletok kostnogo mozga u myshej dvux linij s raznoj radiochuvstvitel'nost'yu posle ostrogo γ-oblucheniya. *Voprosy radiacionnoj bezopasnosti*. 2021; 4: 62–72. Russian.
 19. Biancotti J-C, Town T. Increasing hematopoietic stem cell yield to develop mice with human immune systems. *BioMed Research International*. 2013; 11. DOI: 10.1155/2013/740892.
 20. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 2012; 88: 405–13.
 21. Kišonas J, Venius J, Sevriukova O, Grybauskas M, Dabkevičienė D, Burneckis A, et al. Individual Radiosensitivity as a Risk Factor for the Radiation-Induced Acute Radiodermatitis. *Life*. 2022; 12 (1): 20. Available from: <https://doi.org/10.3390/life12010020>.
 22. Yip H, Haupt C, Maresh G, Zhang X, Li L. Humanized mice for immune checkpoint blockade in human solid tumors. *Am J Clin Exp Urol*. 2019; 7 (5): 313–20. PMID: 31763362; PMCID: PMC6872471.
 23. Golebiewska A, Hau AC, Oudin A, Stieber D, Yabo YA, Baus V, et al. Patient-derived organoids and orthotopic xenografts of primary and recurrent gliomas represent relevant patient avatars for precision oncology. *Acta Neuropathol*. 2020; 140 (6): 919–49. DOI: 10.1007/s00401-020-02226-7. PMID: 33009951; PMCID: PMC7666297.
 24. Nilsson JA, Olofsson Bagge R, Ny L. Mouse avatars take off as cancer models. *Nature*. 2018; 562 (7726): 192. DOI: 10.1038/d41586-018-06982-1. PMID: 30305752.
 25. Rottstegge M, Tipton T, Oestereich L, Ruibal P, Nelson EV, Olal C, et al. Avatar Mice Underscore the Role of the T Cell-Dendritic Cell Crosstalk in Ebola Virus Disease and Reveal Mechanisms of Protection in Survivors. *J Virol*. 2022; 96 (18): e0057422. DOI: 10.1128/jvi.00574-22. PMID: 36073921; PM.