

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК [57+61]::576.53:57.085.23:611.018.46:599.323.4:539.1.047

**МОДЕЛИ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫХ КСЕНОТРАНСПЛАНТАНТОВ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ДЛЯ ОЦЕНКИ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ
РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА**

© 2024 г. Н. И. Атаманюк^{1*}, Е. А. Пряхин¹

¹Уральский научно-практический центр радиационной медицины
Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, Россия

*E-mail: atamanyuk@urcrm.ru

Поступила в редакцию 29.05.2023 г.

После доработки 26.01.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Существуют разные подходы к оценке индивидуальной радиочувствительности человека. В данной работе индивидуальную радиочувствительность оценивали по показателям выживаемости и восстановления гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека после воздействия острого γ -излучения на гуманизированных мышей. Иммунодефицитным мышам NOD SCID трансплантировали ГСК пуповинной крови внутривенно, ГСК периферической или пуповинной крови внутрикостно. Рассчитанная для ГСК человека величина D_0 составила 1.19 Гр (95% ДИ от 0.90 до 1.74), 0.99 Гр (95% ДИ от 0.87 до 1.15) и 0.93 Гр (95% ДИ от 0.61 до 1.91) для трех способов получения гуманизированных мышей соответственно. Для всех трех способов гуманизации мышей получены статистически не отличающиеся модели, описывающие зависимость выживаемости ГСК от дозы острого γ -облучения в диапазоне 0.5–1.5 Гр. Таким образом, внутрикостное введение ГСК периферической крови иммунодефицитным мышам может быть эффективно использовано для оценки реакции ГСК человека на радиационное воздействие. Сравнение числа ГСК (CD34⁺ клеток) и их потомков (CD45⁺ клеток) у необлученных и облученных мышей, гуманизированных клетками одного и того же донора, на 3- и 14-е сутки после облучения позволяет оценивать процессы радиационно-индуцированной гибели и восстановления ГСК. Предложен коэффициент, рассчитанный как отношение доли ГСК среди всех клеток человека в костном мозге гуманизированных мышей на 14-е сутки к доле ГСК на 3-и сутки после облучения, для оценки реакции на радиационное воздействие. Этот коэффициент имел обратную линейную зависимость от дозы облучения, различался у мышей с повышенной и нормальной радиочувствительностью, повышался при применении радиопротектора цистеамина у гуманизированных мышей. Предложено использование этого коэффициента для сравнительной оценки радиочувствительности человека.

Ключевые слова: индивидуальная радиочувствительность, гемопоэтические стволовые клетки, ксенотрансплантация, ионизирующее излучение, тканевые реакции

DOI: 10.31857/S0869803124020019, EDN: NBPVXR

Важной задачей современной радиобиологии является поиск маркеров индивидуальной радиочувствительности для персонализации рисков, связанных с радиационным воздействием, как у профессионалов, работающих с источниками ионизирующих излучений, так и у пациентов, проходящих лучевую терапию [1].

Индивидуальная радиочувствительность может быть рассмотрена по меньшей мере с точки зрения двух различных аспектов действия ионизирующего излучения у разных индивидов при облучении в одной дозе: радиочувствительность целого организма или критических тканей, определяемая как гибель

или развитие детерминированных тканевых эффектов; радиочувствительность тканей как склонность к развитию неблагоприятных отдаленных последствий, радиационно-индуцированного рака [2–4].

Исследованы различные молекулярно-генетические предикторы персонализированных тканевых реакций на радиационное воздействие, хотя не всегда удается выявить связь между молекулярными и клеточными реакциями *in vitro* и тяжестью тканевых реакций на острое облучение [5, 6]. Для возможности индивидуально прогнозировать тяжесть детерминированных тканевых реакций

необходимо определить биомаркеры радиационного воздействия для наиболее важных, критических органов и тканей, определяющих выраженность лучевых поражений. Такие маркеры могут найти применение при отборе персонала группы А для минимизации острых тканевых реакций при планируемом повышенном облучении, для выделения групп риска повышенного развития неблагоприятных побочных эффектов среди пациентов, проходящих лучевую терапию, для отбора космонавтов для длительных космических миссий вне защитного действия магнитного поля земли.

Кроветворная система является одной из критических систем организма, в первую очередь реагирующих на ионизирующее излучение и определяющих тяжесть и характер течения радиационного поражения организма человека и животных [7]. Степень опустошения костного мозга и его последующей репопуляции за счет выживших пролиферирующих клеток является основным интегральным показателем реакции костного мозга на облучение; для костномозговой формы острого лучевого синдрома последствия для организма (вероятность гибели) существенным образом определяются выживаемостью гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и кинетикой выживших клеточных популяций [8, 9].

Одним из перспективных подходов к решению задачи оценки индивидуальных предикторов развития детерминированных тканевых реакций и тяжести лучевого поражения может быть модель гуманизированных животных, полученных путем ксенотрансплантации ГСК человека иммунодефицитным мышам. В такой модели можно оценить реакцию ГСК на облучение, изучить функциональную активность ГСК, оценить вызванные облучением изменения в экспрессии генов и в направлениях дифференцировки облученных клеток [10–12].

Известно, что ГСК и прогениторные клетки человека проявляют индивидуальные отличия радиочувствительности [13], выживаемость и клоногенная активность ГСК может служить предиктором тканевых реакций со стороны костного мозга, определяющих связанную с детерминированными эффектами выживаемость организма после облучения [4, 14]. Моделирование реакции ГСК на облучение при ксенотрансплантации дает возможность разработать новые подходы к оценке персонифицированной реакции ГСК человека на облучение, так как гуманизированные мыши могут рассматриваться как «аватары», отражающие весь

комплекс особенностей реакции клеток, свойственный донору клеток [15–17].

Предложенный в данной работе подход оценки персонифицированной реакции основан на определении выживаемости и сохранения способности к пролиферации и дифференцировке ГСК человека после острого внешнего γ -облучения. Цель работы — разработка модели для изучения индивидуальной радиочувствительности человека на основе оценки выживаемости и сохранения пролиферативной активности ГСК человека в персонифицированных ксенотрансплантатах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве реципиентов клеток человека использовали мышей линии NOD SCID (CB17-Prkdc^{scid}) из Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. Животных содержали в SPF-условиях, на стандартном рационе без ограничения подачи корма и питьевой воды.

Работы с животными и биоматериалом человека одобрены Этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России, проведены с соблюдением международных норм гуманного обращения с экспериментальными животными согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986 г., Страсбург) и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г.

ГСК человека выделяли из пуповинной или периферической крови. Пуповинную кровь после получения добровольного информированного согласия донора отбирали в ГБУЗ “Областной перинатальный центр” г. Челябинска. ГСК периферической крови получали из продукта донорской крови — лейкотромбослоя, изготовленного ГБУЗ “Станция переливания крови” ФМБА России в г. Челябинске.

ГСК идентифицировали как CD45^{low}CD34⁺ клетки, полученные путем иммуномагнитной позитивной селекции с помощью коммерческого набора EasySep Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit II (Stem Cell Technologies, Канада) согласно инструкции производителя. После отмывки клеток в среде 199 с солями Хенкса с глутамином (“ПанЭко”, Россия) подсчитывали их количество на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (BD Biosciences, США). Доля ГСК в полученной клеточной

суспензии составляла 80–90%. Клетки от каждого донора делили на 3–5 равных частей для введения нескольким мышам. Поскольку от каждого донора было получено разное количество ГСК, животные получали от 30 до 200 тыс. клеток при введении ГСК от разных доноров.

Использовали три способа получения гуманизированных мышей. Первая модель является классическим способом получения мышей, гуманизированных гемопоэтическими клетками человека [18]: ГСК пуповинной крови вводили животным внутривенно в боковую хвостовую вену после предварительной миелосупрессии путем воздействия острого внешнего γ -излучения на мышей в дозе 2.5 Гр. Животных подвергали последующему экспериментальному воздействию через 9 нед. после трансплантации ГСК. Таким способом использованы ГСК 12 доноров пуповинной крови.

Через 9 нед. животных подвергали воздействию облучения на исследовательской радиобиологической γ -установке ИГУР-1М (^{137}Cs -источники, мощность дозы 0.91 Гр/мин, неравномерность γ -поля не более 5%) в дозах 0.5 Гр, 1.0 Гр или 1.5 Гр, при этом по одному животному для каждого донора ГСК оставляли необлученным. Через 3 и 14 сут после облучения у мышей извлекали костный мозг из бедренной кости для измерения содержания клеток человека.

Во второй модели использовали ГСК периферической крови. Эти клетки сопоставимы с ГСК пуповинной крови по жизнеспособности и потенциалу дифференцировки, однако значительно хуже приживаются у иммунодефицитных мышей [19]. Поэтому в данной модели не давали дополнительного времени для приживания ГСК, а для повышения уровня химеризма клетки трансплантировали в канал большой берцовой кости со стороны проксимального эпифиза; процедуру проводили с применением изофлуранового наркоза. Клетки от каждого донора (всего девять доноров периферической крови) делили на четырех мышей. При этом двух мышей облучали за 30 мин до трансплантации клеток (ГСК человека не облучены), а двух мышей, получивших клетки от того же донора, облучали через 30 мин после введения ГСК (человеческие клетки облучены). Облучение проводили в дозах 0.5, 1.0 и 1.5 Гр (по три донора на каждую дозу). Через 3 и 14 сут после облучения у животных извлекали ту большую берцовую кость, в которую проводилась инъекция клеток, для анализа числа клеток человека в костном мозге (для каждого срока — одна мышь с необ-

лученными ГСК человека и одна — с получившими облучение клетками).

В третьей модели проводили эксперимент по схеме, описанной для ГСК периферической крови, однако использовали ГСК пуповинной крови (всего девять доноров).

Идентифицировали клетки человека методом проточной цитометрии на цитометре Accuri C6 (BD Biosciences, США) после окраски моноклональными антителами с флуоресцентными метками. Подсчитывали в костном мозге мышинные CD45^+ клетки (окраска моноклональными крысиными антителами антиCD45-PE, клон 30-F11, BD Pharmingen, США); человеческие лейкоцитарные CD45^+ клетки (окраска моноклональными мышинными антителами антиCD45-FITC, клон HI30, Stem Cell Technologies, Канада); человеческие стволовые $\text{CD45}^{\text{low}}\text{CD34}^+$ клетки (окраска моноклональными мышинными антителами антиCD34-APC, клон 581, Stem Cell Technologies, Канада), применяли блокатор Fc-рецепторов мыши Mouse BD Fc Block CD16/CD32 (BD Pharmingen) и блокатор Fc-рецепторов человека Human BD Fc Block (BD Pharmingen). Рассчитывали количество клеток в мл суспензии, полученной из одной кости.

У животных с необлученным ГСК в каждой модели также измеряли содержание CD45^+ клеток человека в периферической крови (в пересчете на 1 мл) и селезенке (в пересчете на орган), содержание CD34^+ клеток в селезенке. Поскольку всем животным трансплантировали разное количество клеток человека, для сравнения моделей результаты стандартизовали на 100 000 введенных ГСК человека.

Во всех моделях рассчитывали отношение числа CD34^+ и CD45^+ клеток через 3 сут после облучения к числу клеток того же донора без облучения (оценка выживаемости клеток), а также через 14 сут после облучения (относительное число клеток, характеризующее эффективность восстановления после облучения). Рассчитывали процентное содержание ГСК от общего количества всех $\text{CD45}^{\text{low}/+}$ клеток человека для каждой гуманизированной мыши. Также определяли коэффициент, равный отношению доли ГСК на 14-е сутки после облучения к доле ГСК на 3-и сутки после облучения ($K_{14/3}$).

Ранее было показано, что этот коэффициент $K_{14/3}$ зависит от дозы радиационного воздействия и может быть использован для оценки радиочувствительности мышей разных линий [20]. Для оценки прогностических свойств коэффициента $K_{14/3}$ для оценки персонафицированной 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 мыши после облучения в дозе 1 Гр у мышей 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).

Во втором эксперименте ГСК, полученные от трех доноров пуповинной крови, использовали для гуманизации не трех, а пяти мышей. Животным за 30 мин до облучения водили 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 измеренных показателей определяли среднее значение и стандартную ошибку. Описывали зависимость изучаемых показателей от дозы методом регрессионного анализа. Для оценки радиочувствительности ГСК рассчитывали по результатам регрессионного анализа выживаемости ГСК через 3 сут после облучения величину D_0 — дозу, при которой выживают 37% клеток от их исходного количества, и ее 95%-ный доверительный интервал. Сравнивали показатели разных моделей с использованием t-критерия Стьюдента, отличия принимали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 указаны результаты измерения клеток человека у гуманизированных животных без облучения ГСК человека в разных моделях.

В модели с внутривенным введением ГСК пуповинной крови и последующим приживлением клеток в течение 9 нед. в костном мозге мышей регистрируется пул стволовых гемопоэтических клеток в количестве, существенно превышающем введенное число ГСК, а также пул созревающих лейкоцитарных $CD45^+$ клеток. Всего на долю клеток человека приходилось от 7 до 70% всех $CD45^+$ клеток костного мозга мыши в зависимости от числа введенных ГСК. Часть $CD45^+$ клеток человека также заселяли селезенку (составляя в ней в среднем 18% от всех человеческих и мышинных $CD45^+$ клеток) и в небольшом количестве регистрировались в периферической крови (в среднем 2.4% от всех лейкоцитов периферической крови).

При введении ГСК периферической крови стволовые клетки человека неспособны к длительной репопуляции в костном мозге животных, однако ранее было показано, что возможно использовать ГСК периферической крови для коротких экспериментов в модели гуманизированных мышей [21].

При сравнении эффективности трансплантации ГСК, полученных из периферической или пуповинной крови, при их введении в костномозговой канал большой берцовой кости видно, что ГСК пуповинной крови обладают способностью к увеличению своей популяции в костном мозге и одновременно к дифференцировке в зрелые $CD45^+$ клетки, в отличие от ГСК периферической крови, количество которых в костном мозге мышей не изменяется в течение 14 сут.

В обеих краткосрочных моделях отмечена сопоставимая способность клеток человека заселять селезенку (в среднем 1.4% всех $CD45^+$ клеток селезенки — человеческие, из них около половины экспрессируют маркер стволовых клеток $CD34^+$) и поддерживать пул зрелых клеток, циркулирующих в периферической крови (в среднем 1.3% от всех лейкоцитов — клетки человека).

На 3-и сутки после облучения во всех моделях выживаемость ГСК описывалась экспоненциальной моделью (рис. 1, А).

Применение регрессионного анализа показало статистически значимую зависимость выживаемости ГСК на 3-и сутки после облучения от дозы. Уравнение (1) для модели с внутривенным введением ГСК пуповинной крови ($R^2 = 0.67$; $F = 38.65$; $p < 0.001$) имело следующий вид:

$$y = 0.98e^{-0.84x}, \quad (1)$$

где y — выживаемость ГСК, x — доза γ -облучения, Гр.

Уравнение (2) для модели ГСК периферической крови имело вид ($R^2 = 0.93$; $F = 211$; $p < 0.001$):

$$y = 0.97e^{-1.1x}, \quad (2)$$

где y — выживаемость ГСК, x — доза γ -облучения, Гр.

Уравнение (3) для модели ГСК пуповинной крови при внутрикостном введении имело вид ($R^2 = 0.55$; $F = 14.90$; $p = 0.002$):

$$y = 0.92e^{-1.1x}, \quad (3)$$

где y — выживаемость ГСК, x — доза γ -облучения, Гр.

Таблица 1. Содержание клеток человека в органах и тканях гуманизированных мышей, $M \pm m$ **Table 1.** Human cell number in organs and tissues of humanized mice, $M \pm m$

Экспериментальная модель		ГСК пуповинной крови внутривенно	ГСК периферической крови внутрикостно		ГСК пуповинной крови внутрикостно	
Время после трансплантации		9 нед.	3 сут	14 сут	3 сут	14 сут
Кровь, тыс. CD45 ⁺ клеток/мл		19 ± 7	7.7 ± 1.6	12 ± 5	18.5 ± 4.3	25.4 ± 1.4
Селезенка, тыс. клеток/орган	CD34 ⁺	13.3 ± 4.5	4.3 ± 2.1	19.5 ± 6.7	4.7 ± 1.8	11.4 ± 4.3
	CD45 ⁺	420 ± 170	10.8 ± 3.5	22 ± 10	11.7 ± 0.4	26.6 ± 4.1
Костный мозг, тыс. клеток/кость*	CD34 ⁺	330 ± 170	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3	2.6 ± 1.5
	CD45 ⁺	990 ± 380	5.5 ± 1.8	5.3 ± 2.3	3.2 ± 0.4	10.5 ± 3.5

Примечание: * — в модели внутривенного введения ГСК пуповинной крови — данные для бедренной кости; в моделях с внутрикостным введением ГСК — данные для большой берцовой кости.

Важно отметить, что модели, описывающие зависимость выживаемости клеток от дозы, полученные для ГСК пуповинной крови с внутривенным введением и периферической крови, не отличались: нет статистически значимых отличий 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 3-и сутки после облучения. Также нет статистически значимых отличий выживаемости ГСК пуповинной крови при внутрикостном введении от выживаемости ГСК пуповинной крови при внутривенном введении при сравнении в уравнениях зависимости коэффициентов ($t = 0.78$; $p = 0.24$) и свободного члена ($t = 0.22$; $p = 0.82$). Нет отличий при сравнении

моделей с внутрикостным введением ГСК пуповинной и периферической крови при сравнении коэффициентов ($t = 0.22$; $p = 0.83$) и свободного члена ($t = 0.32$; $p = 0.75$) в уравнениях зависимости выживаемости ГСК от дозы на 3-и сутки после облучения.

На основании результатов регрессионного анализа выживаемости клеток через 3 сут после облучения были рассчитаны значения D_0 для ГСК. В модели длительного приживления ГСК пуповинной крови значение D_0 составило 1.19 Гр, в модели с ГСК периферической крови D_0 была равна 0.99 Гр, а в краткосрочной модели ГСК пуповинной крови D_0 имела значение 0.93 Гр. Все величины D_0 оказались близки друг к другу (рис. 2) и соот-

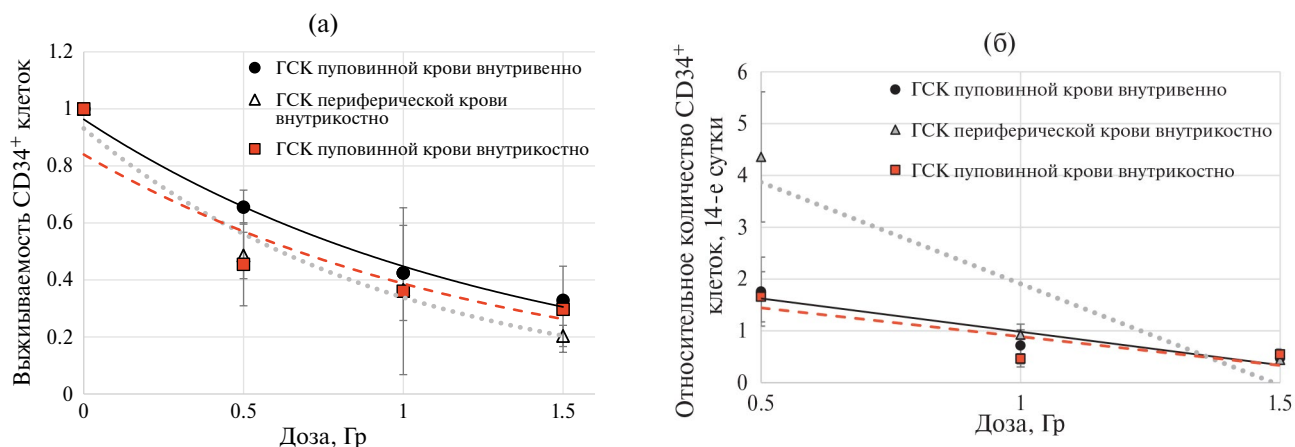


Рис. 1. Относительное количество ГСК человека после облучения по отношению к необлученному контролю в трех моделях гуманизированных животных. А — 3-и сутки после облучения; Б — 14-е сутки после облучения.

Fig. 1. Human HSC number after irradiation relative to non-irradiated control in three humanized mice models. А — 3rd day after irradiation; Б — 14th day after irradiation.

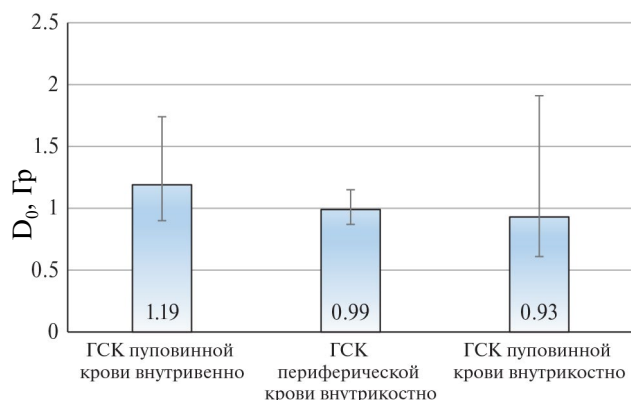


Рис. 2. D_0 для ГСК человека, рассчитанная в разных моделях получения гуманизированных мышей.

Fig. 2. D_0 for human HSCs, estimated in different humanized mice models.

ветствовали литературным данным, приводящим значение D_0 для ГСК человека около 1 Гр [22].

На 14-е сутки после облучения количество клеток по отношению к необлученному контролю описывалось линейной функцией, имело обратную зависимость от дозы (для модели ГСК пуповинной крови модель статистически не значима; для ГСК периферической крови $R^2 = 0.65$; $F = 12.90$; $p = 0.009$; для ГСК пуповинной крови при внутрикостном введении $R^2 = 0.44$; $F = 5.5$; $p = 0.05$) (рис. 1, Б). Следует отметить, что после облучения в дозе 0.5 Гр количество ГСК могло как превышать их контрольный уровень у необлученных животных (относительное количество ГСК больше 1), так и оставаться сниженным у отдельных доноров.

Уравнения, описывающие изменение относительного количества $CD34^+$ клеток на 14-е сутки после облучения, не имели статистически значимых отличий друг от друга. Для моделей с внутривенным введением ГСК пуповинной крови и внутрикостным введением ГСК периферической крови нет статистически значимых отличий 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. Также нет статистически значимых отличий при сравнении угла наклона ($t = 0.22$; $p = 0.83$) и свободного члена ($t = 0.22$; $p = 0.83$) в уравнениях зависимости относительного числа клеток от дозы на 14-е сутки после облучения в моделях с внутривенным и внутрикостным введением ГСК пуповинной крови. Нет отличий при сравнении моделей с внутрикостным введением ГСК пуповинной и периферической крови при

сравнении угла наклона ($t = 0.52$; $p = 0.61$) и свободного члена ($t = 0.69$; $p = 0.49$) в уравнениях зависимости относительного числа клеток от дозы на 14-е сутки после облучения.

Было выявлено дозозависимое снижение выживаемости созревающих $CD45^+$ клеток человека на 3-и сутки после облучения у гуманизированных мышей во всех трех моделях (рис. 3, А). Зависимость количества $CD45^+$ клеток человека от дозы статистически значимо описывалась линейной моделью (для модели с внутривенным введением ГСК пуповинной крови $R^2 = 0.71$; $F = 45.94$; $p < 0.001$; для модели с внутрикостным введением ГСК периферической крови $R^2 = 0.92$; $F = 192$; $p < 0.001$; для модели с внутрикостным введением ГСК пуповинной крови $R^2 = 0.49$; $F = 11.66$; $p = 0.005$).

Если на 3-и сутки после облучения количество $CD45^+$ клеток у облученных гуманизированных мышей всегда было меньше, чем у необлученных

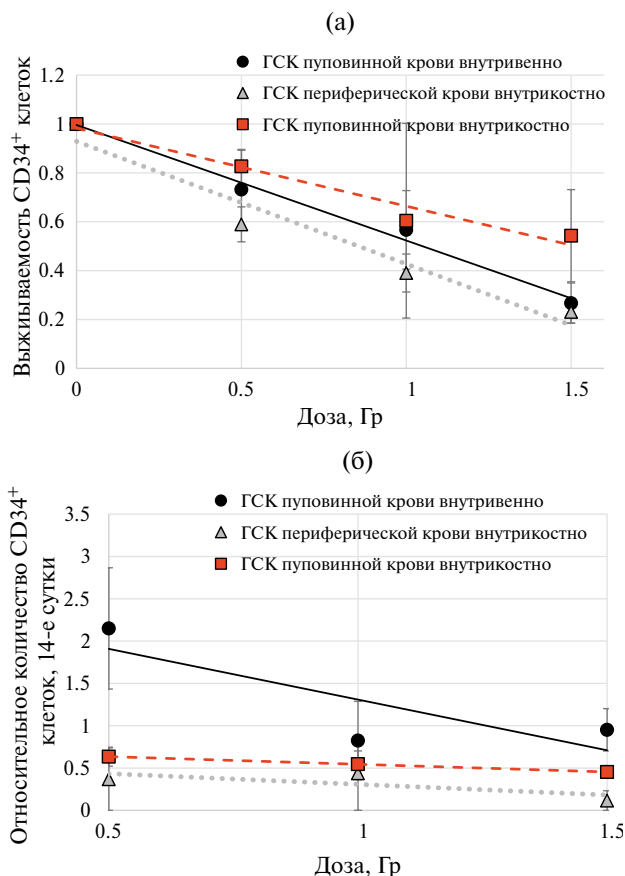


Рис. 3. Относительное количество $CD45^+$ клеток человека после облучения по отношению к необлученному контролю в трех моделях гуманизированных животных. А — 3-и сутки после облучения; Б — 14-е сутки после облучения.

Fig. 3. Human $CD45^+$ cell number after irradiation relative to non-irradiated control in three humanized mice models. А — 3rd day after irradiation; В — 14th day after irradiation.

животных, получивших ГСК от того же донора, то на 14-е сутки после облучения содержание $CD45^+$ клеток увеличивалось и у некоторых доноров превышало этот показатель у необлученных мышей, гуманизированных клетками того же донора (рис. 3, Б). Статистически значимой зависимости количества $CD45^+$ клеток от дозы через 14 сут после облучения получено не было.

Как было показано в работе [20], отношение доли ГСК на 14-е сутки после облучения к доле ГСК на 3-и сутки после облучения у мышей зависело от дозы и было связано с радиочувствительностью мышей разных линий. В настоящей работе этот коэффициент был рассчитан для описания изменения доли ГСК человека после облучения гуманизированных мышей. Во всех трех моделях коэффициент $K_{14/3}$ имел обратную линейную зависимость от дозы. В модели с внутривенным введением ГСК пуповинной крови зависимость коэффициента $K_{14/3}$ от дозы облучения описывалась уравнением (4) ($R^2 = 0.57$; $F = 13.26$; $p = 0.005$):

$$y = 1.03 - 0.41x \quad (4)$$

где y — $K_{14/3}$, x — доза γ -облучения, Гр.

В модели с внутрикостным введением ГСК периферической крови зависимость коэффициента $K_{14/3}$ от дозы облучения описывалась уравнением (5) ($R^2 = 0.45$; $F = 5.67$; $p = 0.048$):

$$y = 3.5 - 2.1x, \quad (5)$$

где y — $K_{14/3}$, x — доза γ -облучения, Гр.

Для модели с внутрикостным введением ГСК пуповинной крови зависимость коэффициента

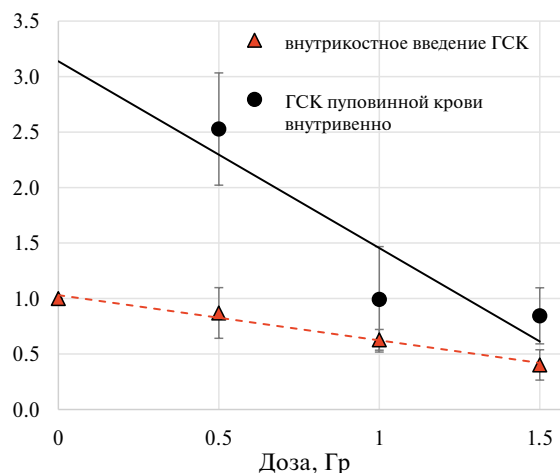


Рис. 4. Зависимость коэффициента $K_{14/3}$ от дозы для моделей с разным способом введения ГСК.

Fig. 4. $C_{14/3}$ coefficient dependence on the dose for models with different methods of HSC administration.

$K_{14/3}$ от дозы облучения описывалась уравнением 6 ($R^2 = 0.25$; $F = 2.04$; $p = 0.2$):

$$y = 2.8 - 1.2x, \quad (6)$$

где y — $K_{14/3}$, x — доза γ -облучения, Гр.

В модели ГСК пуповинной крови с длительным приживлением коэффициент $K_{14/3}$ оказался ниже, чем в моделях короткого эксперимента, что может быть связано с отличиями в кинетике клеточных популяций сразу после трансплантации и спустя 9 нед., необходимых для установления равновесного состояния пула ГСК в костном мозге гуманизированной мыши (рис. 4). Однако нет статистически значимых отличий в моделях зависимости коэф-

Таблица 2. Изменение коэффициента $K_{14/3}$ в экспериментальных моделях высокой и низкой радиорезистентности

Table 2. Change in the $C_{14/3}$ coefficient in experimental models of high and low radioresistance

Радиочувствительная модель		Радиорезистентная модель	
Разные линии мышей			
NOD SCID		C57Bl/6	
0.23 ± 0.06		0.98 ± 0.18* <i>t</i> = 3.9; <i>p</i> < 0.003	
Гуманизированные мыши			
донор 1, доза 0.5 Гр	0.45 ± 0.03	1.2 ± 0.12* <i>t</i> = 6.0; <i>p</i> < 0.001	
донор 2, доза 0.5 Гр	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.18* <i>t</i> = 2.0; <i>p</i> = 0.04	
донор 3, доза 1.0 Гр	0.50 ± 0.1	1.2 ± 0.08* <i>t</i> = 5.3; <i>p</i> < 0.001	

* Статистически значимые отличия от радиочувствительной модели.

коэффициента $K_{14/3}$ от дозы для ГСК периферической и пуповинной крови в краткосрочном тесте при внутрикостном введении, при сравнении коэффициента угла наклона прямой $t = 0.72$; $p = 0.48$, при сравнении свободного члена $t = 0.56$; $p = 0.58$. Поэтому результаты оценки коэффициента $K_{14/3}$ в моделях с внутрикостным введением ГСК были описаны одной зависимостью, представленной в уравнении (7) ($R^2 = 0.35$; $F = 8.07$; $p = 0.01$):

$$y = 1.7 - 3.2x, \quad (7)$$

где y — $K_{14/3}$, x — доза γ -облучения, Гр.

В двух отдельных экспериментах была проведена валидация применения коэффициента $K_{14/3}$ для оценки радиочувствительности. В одном эксперименте рассчитывали коэффициент для мышей радиочувствительной линии NOD SCID (ЛД_{50/30} = 3.5 Гр) и мышей с обычной радиочувствительностью C57Bl/6 (ЛД_{50/30} = 6.0 Гр). В другом эксперименте сравнивали коэффициент у гуманизированных животных, где повышенную радиорезистентность моделировали путем введения цистеамина за 30 минут до облучения. У мышей линии C57Bl/6 и гуманизированных мышей, защищенных радиопротектором, $K_{14/3}$ был статистически значимо выше (табл. 2).

Таким образом, расчет коэффициента $K_{14/3}$ на основании данных о количестве ГСК и CD45⁺ клеток на 3-и и 14-е сутки после облучения для данного донора в модели персонифицированных ксенотрансплантантов ГСК может быть использован для оценки индивидуальной радиочувствительности человека. При этом более высокие значения коэффициента $K_{14/3}$ можно интерпретировать как проявления более высокой радиорезистентности. На рис. 5 представлено распределение значений коэффициента $K_{14/3}$ по отношению к среднему значению $K_{14/3}$ в каждой дозовой группе для 17 доноров. Распределение этого показателя хорошо (критерий Колмогорова—Смирнова 0.13; $p = 0.90$; критерий $\chi^2 = 0.31$, $p = 0.57$) описывается логнормальным распределением. Как видно из рис. 5, среди исследованных доноров можно выделить отдельных лиц с повышенными значениями коэффициента $K_{14/3}$, которых можно охарактеризовать как радиорезистентных. Доля таких доноров в исследованной выборке составила 17%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Модель получения гуманизированных мышей путем внутривенного введения ГСК пуповинной крови после облучения мышей в сублетальной дозе

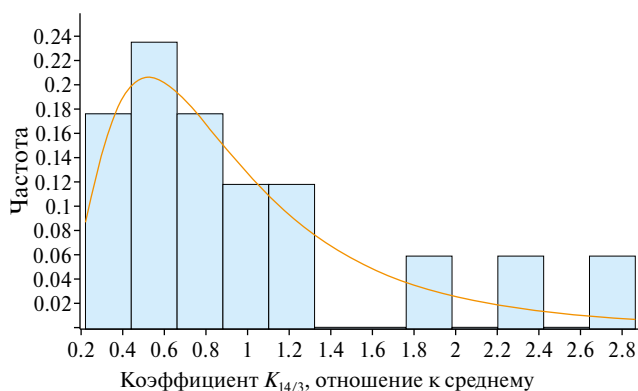


Рис. 5. Распределение значений коэффициента $K_{14/3}$ по отношению к среднему значению $K_{14/3}$ в каждой дозовой группе для обследованных доноров.

Fig. 5. Distribution of $C_{14/3}$ coefficient values in relation to the average $C_{14/3}$ value in each dose group for the studied donors.

является распространенным методом, нашедшим свое применение в разных областях экспериментальной биологии и биомедицины [18]. Однако пуповинная кровь не может рассматриваться как источник ГСК для целей оценки индивидуальных реакций ГСК взрослых людей. Применение ГСК, полученных из мобилизованной с помощью ГКСФ периферической крови, оказывается менее эффективным, чем ГСК пуповинной крови [19], кроме того, мобилизация ГСК в периферическую кровь является болезненной процедурой. Более удобным было бы использование ГСК из немобилизованной периферической крови у взрослых людей, работа с которыми возможна в относительно короткий промежуток времени после введения.

Для решения вопроса о возможности использовать ГСК немобилизованной периферической крови для оценки их выживаемости и восстановления после облучения сравнивали показатели ГСК после острого γ -облучения в трех моделях: внутривенном введении ГСК пуповинной крови с длительным (9 нед.) временем приживания клеток; внутрикостном введении ГСК периферической крови с одновременным введением и облучением; внутрикостном введении ГСК пуповинной крови с одновременным введением и облучением.

Проведенные исследования показали, что внутрикостное введение ГСК периферической или пуповинной крови в модели без длительного приживания клеток позволяет получать гуманизированных мышей с достаточным для регистрации методом проточной цитометрии количеством ГСК

и созревающих и зрелых лейкоцитарных клеток в костном мозге животных.

Описана экспоненциальная зависимость от дозы острого внешнего γ -облучения для выживаемости ГСК и линейная зависимость для лейкоцитарных CD45⁺ клеток человека на 3-и сутки после облучения во всех трех моделях; линейная зависимость от дозы относительного количества ГСК человека на 14-е сутки после облучения. Показано, что полученные в разных моделях зависимости не отличаются друг от друга и позволяют рассчитать схожие значения D_0 для ГСК человека. Все величины D_0 совпадают с литературными данными, приводящим значение D_0 для ГСК человека в пределах 1 Гр [22], что указывает на пригодность моделей для оценки острой реакции ГСК человека на облучение.

Дозозависимое снижение числа ГСК у гуманизированных мышей было описано ранее другими авторами, однако ранее не оценивали восстановление ГСК у гуманизированных мышей спустя длительное время после облучения [23]. В нашей работе для моделей, описывающих зависимость от дозы выживаемости клеток человека на 3-и сутки после облучения, получены более высокие уровни значимости, чем для моделей, описывающих зависимость от дозы числа клеток на 14-е сутки, в период восстановления. Таким образом, радиационно-индуцированная гибель стволовых CD45^{low}CD34⁺ и созревающих и зрелых CD45⁺ клеток определяется в большей степени дозой, нежели индивидуальными отличиями клеток от разных доноров, в то время как последующее восстановление ГСК и CD45⁺ клеток зависит от дозы в меньшей степени и, вероятно, может определяться индивидуальной вариабельностью.

Эти индивидуальные особенности успеха восстановления числа ГСК и CD45⁺ клеток после облучения было предложено отразить в интегральном показателе, представляющем собой отношение доли ГСК от всех лейкоцитарных клеток человека на 14-е сутки после облучения к этому показателю на 3-и сутки после облучения (коэффициент $K_{14/3}$). Коэффициент отражает как радиационно-индуцированную гибель стволовых клеток на 3-и сутки после облучения, так и успешность их пролиферации и дифференцировки на 14-е сутки после облучения, и связан с выживаемостью ГСК и их репопуляцией. У гуманизированных мышей во всех трех моделях этот коэффициент имел четкую обратную зависимость от дозы, что позволяет использовать его для оценки выраженности реакции на облучение. Снижение

$K_{14/3}$ с дозой, существенные различия этого показателя у мышей с разной радиочувствительностью, повышение коэффициента в модели индуцированной цистеамином радиорезистентности у гуманизированных мышей указывает на то, что коэффициент может быть использован для описания биологической реакции кроветворной ткани на облучение, и что более низкие значения показателя ассоциированы с более выраженным влиянием ионизирующего излучения.

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 [7].

На основании сходства полученных в трех моделях зависимостей от дозы для выживаемости ГСК человека и коэффициента $K_{14/3}$ можно заключить, что модель с внутрикостным введением ГСК немобилизованной периферической крови мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом может быть использована для оценки реакции ГСК на острое внешнее γ -облучение. В модели регистрируются индивидуальные отличия, касающиеся в основном разной способности восстанавливать пул ГСК и количество созревающих CD45⁺ клеток через 14 сут. после облучения.

Предложенный для анализа в данной модели коэффициент $K_{14/3}$ подвержен индивидуальным вариациям и ассоциирован с радиочувствительностью (чем ниже коэффициент, тем выше радиочувствительность), его оценка в предложенной модели может дать сравнительную характеристику чувствительности реакции гемопоэза отдельных индивидов на радиационное воздействие.

Сохранение и эффективное восстановление пула стволовых клеток может быть важно не только для эффективного восстановления костномозгового кроветворения, но и для снижения риска отдаленных последствий облучения со стороны кроветворной системы. Предложенный способ внутрикостной трансплантации ГСК периферической крови дает широкие возможности для оценки других персонифицированных показателей стволовых клеток человека: экспрессии генов, клоногенной активности, спектра дифференцировки ГСК и других параметров, изменяющихся после воздействия ионизирующего излучения [8, 24, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что внутрикостное введение ГСК периферической крови иммунодефицитным мышам может быть эффективно использовано для оценки реакции ГСК человека на радиационное воздействие. При этом анализ относительного числа ГСК (CD34⁺ клеток) и их потомков (CD45⁺) позволяет оценивать процессы радиационно-индуцированной гибели и восстановления ГСК. Предложено использование коэффициента, рассчитанного как отношение доли ГСК среди всех клеток человека в костном мозге гуманизированных мышей на 14-е сутки к доле ГСК на 3-и сутки после облучения, для сравнительной оценки радиочувствительности человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по государственному заданию ФМБА России, регистрационный N НИОКТР АААА-А20-120120790018-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Applegate K.E., Rühm W., Wojcik A. et al. Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection. *Radiat. Environ. Biophys.* 2020;59(2):185–209. <https://doi.org/10.1007/s00411-020-00837-y>
- Human radiosensitivity. Report of the independent advisory group on ionising radiation documents of the Health Protection Agency. London. 2013. 164 p.
- Radiation Protection N°171 Individual radiosensitivity / EU Scientific Seminar 2011. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 2012. 71 p.
- Ferlazzo M.L., Bourguignon M., Foray N. Functional assays for individual radiosensitivity: a critical review. *Semin. Radiat. Oncol.* 2017;27(4):310–315. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.003>
- Kišonas J., Venius J., Sevriukova O. et al. Individual radiosensitivity as a risk factor for the radiation-induced acute radiodermatitis. *Life.* 2022;12(1):20. <https://doi.org/10.3390/life12010020>
- Brzozowska K., Pinkawa M., Eble M.J. 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;88:405–413.
- ICRP Statement on tissue reactions / Early and late effects of radiation in normal tissues and organs — Threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. ICRP Publication 118. Ann. ICRP 41(1/2). 2012. 322 p.
- Shao L., Luo Y., Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid. Redox. Signal.* 2014;20(9):1447–1462. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5635>
- Flidner T.M., Graessle D.H. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation. *Radiat. Environ. Biophys.* 2008;47:63–69. <https://doi.org/10.1007/s00411-007-0148-6>
- Hoehn D., Pujol-Canadell M., Young E.F. et al. Effects of high- and low-LET radiation on human hematopoietic system reconstituted in immunodeficient mice. *Radiat. Res.* 2019;191(2): 162–175. <https://doi.org/10.1667/RR15148.1>
- Ghandhi S.A., Smilenov L., Shuryak I. et al. Discordant gene responses to radiation in humans and mice and the role of hematopoietically humanized mice in the search for radiation biomarkers. *Sci. Rep.* 2019;9(1):19434. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55982-2>
- Tsogbadrakh B., Jung J.A., Lee M. et al. Identifying serum miRNA biomarkers for radiation exposure in hematopoietic humanized NSG-SGM3 mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022;599:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.010>
- Kato K., Omori A., Kashiwakura I. Radiosensitivity of human haematopoietic stem/progenitor cells. *J. Radiol. Prot.* 2013;33(1):71–80. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/33/1/71>
- Worley J.R., Parker G.C. Effects of environmental stressors on stem cells. *World J Stem Cells.* 2019;11(9):565–577. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i9.565>
- Golebiewska A., Hau A.C., Oudin A. 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):919–949. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02226-7>
- Ilmer M., Berger M. Avatars to personalized medicine: of mice and men. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2017;6(5):347–349. <https://doi.org/10.21037/hbsn.2017.06.05>
- Yao L.C., Aryee K.E., Cheng M. et al. Creation of PDX-bearing humanized mice to study immuno-oncology. *Meth. Mol. Biol.* 2019;1953:241–252. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7_15
- Ito R., Takahashi T., Ito M. Humanized mouse models: application to human diseases. *J. Cell Physiol.* 2018;233(5):3723–3728.
- Walcher L., Hilger N., Wege A.K. et al. Humanized mouse model: hematopoietic stemcell transplantation and tracking using short tandem repeat technology. *Immun. Inflamm. Dis.* 2020;8(3):363–370. <https://doi.org/10.1002/iid3.317>
- Атаманюк Н.И., Стяжкина Е.В., Обвинцева Н.А. и др. Кинетика гибели и восстановления клеток костного мозга у мышей двух линий с разной радиочувствительностью после острого γ-облучения. *Вопр. радиац. безопасности.* 2021;104(4):62–72. [Atamanyuk N.I., Styazhkina E.V., Obvintseva N.A. et al. Kinetics of bone marrow cell death and recovery in two mice strains with different radiosensitivity after acute gamma radiation exposure. *J. Radiat. Safety Issues.* 2021;104(4):62–72. (In Russ.)]
- Атаманюк Н.И., Пряхин Е.А., Андреев С.С. и др. Использование ксенотрансплантации гемопоэтических клеток человека, выделенных из периферической крови взрослых людей и пуповинной крови, иммунодефицитным мышам для изучения действия ионизирующего излучения. *Вопр. радиац. безопасности.* 2021;101(1):72–83. [Atamanyuk N.I., Pryakhin E.A., Andreev S.S. et al. Use of xenotransplantation of human hematopoietic cells isolated from human peripheral blood and umbilical cord blood to immunodeficient mice for

- studying the effect of ionizing radiation. *J. Radiat. Safety Issues*. 2021;101(1):72–83. (In Russ.)]
22. Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the radiologist. Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019. 1160 p.
 23. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132041>.
 24. Yoshida K., Satoh Y., Uchimura A. et al. Massive expansion of multiple clones in the mouse hematopoietic system long after whole-body X-irradiation. *Sci. Rep.* 2022;12 (1):17276. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21621-6>
 25. Brojakowska A., Kour A., Thel M.C. et al. Retrospective analysis of somatic mutations and clonal hematopoiesis in astronauts. *Commun. Biol.* 2022;5:828. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03777-z>

Models of Patient Derived Hematopoietic Stem Cell Xenografts for Assessing Individual Human Radiosensitivity

N. I. Atamanyuk*, E. A. Pryakhin

Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

*E-mail: atamanyuk@urcrm.ru

There are different approaches to assessing the human individual radiosensitivity. In this study, individual radiosensitivity was assessed in terms of survival and recovery of human hematopoietic stem cells (HSC) after acute gamma irradiation of humanized mice. Immunodeficient NOD SCID mice were transplanted with cord blood HSC intravenously, peripheral or umbilical cord blood HSC intraosseously. The estimated D_0 value for human HSCs was 1.19 Gy (95% CI 0.90 to 1.74), 0.99 Gy (95% CI 0.87 to 1.15), and 0.93 Gy (95% CI 0.61 to 1.91) for the three methods of obtaining humanized mice, respectively. For all three methods of mouse humanization, statistically similar models that describe the dependence of HSC survival on the acute gamma irradiation dose in the range of 0.5–1.5 Gy were obtained. Thus, intraosseous administration of peripheral blood HSCs to immunodeficient mice can be effectively used to assess the response of human HSCs to radiation exposure. Comparison of the HSC number ($CD34^+$ cells) and their descendants ($CD45^+$ cells) in non-irradiated and irradiated mice humanized with cells from the same donor on days 3 and 14 after irradiation makes it possible to evaluate the processes of radiation-induced death and recovery of HSCs. A coefficient calculated as the ratio of the proportion of HSCs among all human cells in the bone marrow of humanized mice on the 14th day to the proportion of HSCs on the 3rd day after irradiation was proposed to assess the response to radiation exposure. This coefficient had an inverse linear dependence on the radiation dose, differed in mice with increased and normal radiosensitivity, and increased with the use of the radioprotector cysteamine in humanized mice. We propose to use this coefficient for a comparative assessment of human radiosensitivity.

Keywords: individual radiosensitivity, hematopoietic stem cells, xenotransplantation, ionizing radiation, tissue reactions

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Атаманюк Наталья Игоревна (Atamanyuk Natalia Igorevna), atamanyuk.urcrm.ru,
<https://orcid.org/0000-0001-8293-2730>

Пряхин Евгений Александрович (Pryakhin Evgeny Alexandrovich),
<https://orcid.org/0000-0002-5990-9118>

Вклад авторов: все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interests.