

Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЭПИТЕЛИЯ КИШЕЧНИКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
ГБОУ ВПО УГМУ, кафедра патологической физиологии

Проблема клеточного восстановления после воздействия повреждающего фактора продолжает оставаться актуальным вопросом современной биологии и медицины. Трансплантация стромальных клеток способна ускорить процесс приживания введенных гемопоэтических стволовых клеток [5, 7]. Эффективность применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в качестве котрансплантата обусловлена их способностью вырабатывать биологически активные вещества, формировать межклеточные контакты, а также пластичностью [9, 10]. В последние годы доказан феномен слияния гемопоэтических клеток со специализированными клетками кишечного эпителия [11, 12]. При этом было показано, что этот процесс не инициирует развитие опухоли. Учитывая свойства плацентарных ММСК и ГСК, их совместное введение представляется перспективным и может обеспечить регенерацию после воздействия экстремального фактора [4, 6, 8]. Указанное выше позволило сформулировать цель настоящего исследования: изучение влияния сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию кишечника в условиях воздействия экстремальных факторов.

Методы исследования

Эксперименты выполнены на 90 зрелых лабораторных мышах-самцах в возрасте 6–8 месяцев с массой 18–22 г и 90 старых мышах-самцах в возрасте 20–22 месяцев с массой 25–30 г. Зрелые и старые лабораторные животные были разделены на две группы соответственно. В каждой группе были выделены опытная и контрольная подгруппы. Животным опытной подгруппы внутривенно вводились ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Животным контрольной подгруппы вводили 0,9% раствор NaCl. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после экстремального воздействия однократно. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки по-

сле облучения и на 5 сутки после острой кровопотери.

Получение клеточной культуры ММСК и ГСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. При этом моноклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной (раствор аккутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты [2]. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 (StemCell Technologies, США) и CD 117 (StemCell Technologies, США).

Облучение животных проводилось на гамма-терапевтической установке типа АГАТ – С с радионуклидным источником $Co - 60$, поглощенная доза составила 4,0 Гр, мощность поглощенной дозы 20 сГр/мин [1]. Острая кровопотеря была вызвана кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2% от массы тела животного.

Оценка регенераторных процессов в слизистой оболочке тощей кишки осуществлялась с помощью расчетов индекса пролиферации (ИП), апоптотического индекса (АИ). Средняя клеточность в одной крипте (СКК) была определена как отношение числа криптальных клеток к количеству анализированных крипт. Пролиферативная активность клеток определялась как отношение иммунопозитивных ядер эпителиоцитов по белку Ki-67 к общему числу подсчитанных ядер эпителиоцитов. Верификация выраженности апоптоза осуществлялась с использованием метода ApopTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) (Millipore, США). Апоптотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу подсчитанных эпителиоцитов.

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведено по критерию Манна-Уитни (U). Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Вероятность различий считалась достоверной при значениях $p < 0,05$ [3].

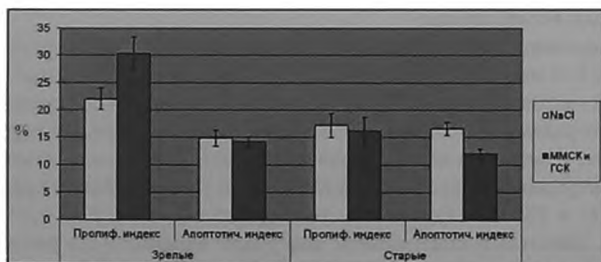


Рис. 1. Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки в физиологических условиях на 7 сутки после трансплантации стволовых клеток

Результаты исследования

Проведенные исследования позволили установить, что в физиологических условиях на 1 сутки сочетанное введение ММСК и ГСК зрелым и старым лабораторным животным не приводит к существенным изменениям в эпителии тощей кишки.

На 5 сутки в физиологических условиях на фоне введения стволовых клеток установлено увеличение пролиферативной активности в эпителии тощей кишки на 22,5% ($p < 0,05$). У старых животных пролиферативная активность клеток оставалась без изменений. Однако уровень запрограммированной клеточной гибели снизился на 21,7% ($p < 0,05$). Ингибирование апоптоза в настоящем случае можно также объяснить выработкой ММСК цитопротективных факторов, которые, поддерживая работу ферментов репарации, косвенно приводят к снижению запрограммированной клеточной гибели.

На 7 сутки после введения стволовых клеток у зрелых и старых лабораторных животных произошло увеличение содержания клеток криптально-го эпителия. Однако механизмы этого увеличения в изучаемых возрастных группах разные. У зрелых животных это увеличение достигается за счет повышения пролиферативной активности эпителия на 37,9% ($p < 0,05$), в то время как у старых животных за счет угнетения выраженности апоптоза на 22,7% ($p < 0,05$) (рис. 1).

На первые сутки после воздействия ионизирующего излучения (ИИ) на фоне введения стволовых клеток при определении активности апоптоза в эпителии кишечника у старых животных выявлено снижение данного показателя на 21,7% ($p < 0,05$). У зрелых животных, в отличие от старых, существенных изменений в эпителии тощей кишки установлено не было.

При анализе регенерации эпителия тощей кишки у зрелых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне трансплантации стволовых клеток отмечено увеличение количества эпителиоцитов крипт за счет увеличения пролиферативной активности клеток криптально-

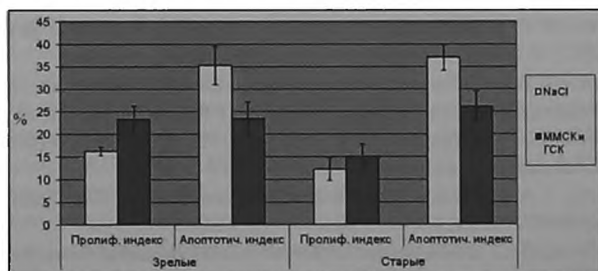


Рис. 2. Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери

го эпителия на 35,4% ($p < 0,05$), а также снижения запрограммированной клеточной гибели на 46,7% ($p < 0,05$). У старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ трансплантация ММСК и ГСК не приводит к существенному изменению уровня пролиферативной активности. Увеличение количества эпителиоцитов крипт в этой возрастной группе на 30,8% ($p < 0,05$) достигалось за счет снижения уровня апоптоза.

На 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК установлено увеличение средней клеточности крипты у зрелых и старых лабораторных животных соответственно на 30,1% ($p < 0,05$) и 34,2% ($p < 0,05$). При этом механизм указанных изменений в изучаемых возрастных группах различный. Так, у зрелых лабораторных животных установлено повышение пролиферативной активности клеток на 43,0% ($p < 0,05$) и снижение выраженности запрограммированной клеточной гибели эпителиоцитов на 33,6% ($p < 0,05$). В то же время у старых животных отмечено лишь ингибирование апоптоза ($-29,3\%$, $p < 0,05$) (рис. 2).

Таким образом, в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК у зрелых и старых животных сопровождается увеличением содержания эпителиоцитов крипт тощей кишки. В физиологических условиях у зрелых животных этот эффект реализуется через увеличение пролиферативной активности эпителиоцитов, в то время как у старых — через ингибирование апоптоза. В условиях воздействия экстремальных факторов увеличение содержания клеточной популяции крипт у зрелых животных достигается за счет повышения пролиферативной активности и угнетения апоптоза эпителиоцитов, а в старом организме — за счет ингибирования апоптоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алчинова, И.Б. Динамика изменения физиологических показателей мышей с различной радиочувствительностью после острого гамма-облучения / И.Б.Алчинова, Е.Н.Архипова, Ю.С.Медведева, А.Б.Черепов, М.Ю.Карганов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. Т.157, № 2. – С. 150-154.
2. Верясов, В.Н. Получение мезенхимальных стромальных клеток из внезародышевых тканей и их характеристика / В.Н.Верясов, А.М.Савилова, О.А.Буяновская, М.М.Чулкина, С.В.Павлович, Г.Т.Сухих // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. - № 1. – С.3-10.
3. Гланц, С.А. Медико-биологическая статистика / С.А. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
4. Гребнев, Д.Ю. Влияние цитопротективной терапии тизолом на процессы регенерации миелоидной ткани и эпителия тощей кишки при воздействии ионизирующего излучения: дис. на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук: 14.00.16 / Гребнев Дмитрий Юрьевич. – Екатеринбург, 2006. – 208 с.

5. Гребнев, Д.Ю. Перспектива применения сочетанной трансплантации стволовых клеток для восстановления гемопоэза / Д.Ю. Гребнев // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. - № 3 (40). – С. 67-68.

6. Маклакова, И.Ю. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных при воздействии экстремальных факторов: дис. на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. / Маклакова Ирина Юрьевна. – Екатеринбург, 2010. – 205 с.

7. Пат. 2394585 Российская Федерация, МПК А 61 К 35/50, А 61 Р 35/00, А 61 N 5/10. Способ восстановления миелоидной ткани старых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов; заявитель Государственное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»), патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Инномедцентр» (ООО «Инномедцентр»). - № 2008152842/14; заявл. 30.12.2008; опубл. 20.07.2010 // Изобретения. Полезные модели. – 2010. Бюл. № 20 (III ч.). – С. 790.

8. Ястребов, А.П. Экспериментальное обоснование использования сочетанной трансплантации стволовых клеток для коррекции регенерации быстрообновляющихся тканей после лучевого повреждения / А.П.Ястребов, Д.Ю.Гребнев, И.Ю.Маклакова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. - № 2(39). – С. 141.

9. Lange, C. Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation / C.Lange, B.Brunswig-Spickenheier, H.Cappallo-Obermann // Public Library of Science. – 2011. - P. 136 – 144.

10. Matsumoto, T. Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine / T.Matsumoto, R.Okamoto // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 128. – P. 1851-1867.

11. Barcena, A. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development / A.Barcena, M.Kapidzic, M.O.Muench, M.Gormley, M.A.Scott, J.F.Weier, C.Ferlatte, S.J.Fisher // Development Biology. - 2009. – Vol. 327. - P.24-33.

12. Chen, L. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing / L.Chen, E.E.Tredget, P.Y.Wu, Y.Wu // Public Library of Science. – 2008. – Vol. 3, № 4. – P.1886.