



Гребнев Дмитрий Юрьевич

Ведущий научный сотрудник лаборатории антивозрастных технологий ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий
Заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»
д.м.н.
г. Екатеринбург

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

ВОЗМОЖНОСТИ АКТИВАЦИИ КРОВЕТВОРЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Лаборатория антивозрастных технологий ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург;
ФГБОУ ВО «Уральская государственный медицинский университет»,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

До недавнего времени костный мозг считали единственным источником ГСК. При этом содержание ГСК в костном мозге весьма незначительное и составляет 0,01%, а вместе с клетками-предшественниками — 0,05%. Известно, что ключевая роль в восстановлении гемопоэза принадлежит именно ГСК. Количество ГСК в периферической крови взрослого организма примерно в 100 раз меньше, чем в костном мозге. Поэтому были предприняты попытки увеличить содержание ГСК в периферической крови [6]. Эти попытки оказались относительно успешными. Использование колониестимулирующих факторов (Г-КСФ, ГМ - КСФ) позволило увеличить количество ГСК в периферической крови в 10 раз. Однако проблема недостаточного для эффективной терапии содержания ГСК в применяемых образцах по-прежнему оставалась.

ГСК выделенные из пуповинной крови обладают большей способностью к самообновлению и большим пролиферативным потенциалом, чем ГСК, выделенные из костного мозга. ГСК выделенные из плаценты человека имеют более высокий уровень экспрессии CD 90 и CD 31 по сравнению с образцами пуповинной крови [7]. ГСК с кластером дифференцировки CD 90+ проявляют существенно большую клоногенную активность, чем ГСК CD 90-.

Содержание ГСК в плаценте превышает количество ГСК в доступном объеме пуповинной крови. Эти клетки сохраняют способность дифференцироваться во все клетки крови. Было показано, что зрелая плацента человека может быть источником ГСК, при этом криоконсервирование плаценты может быть альтернативным и эффективным способом сохранения ГСК в количестве, достаточном для активации кроветворения у пациентов зрелого и пожилого возраста. В тоже

время известно, что при старении происходит существенное снижение количества стволовых клеток в организме, снижение чувствительности к стимулирующим их пролиферацию и дифференцировку факторам роста [4, 5].

В ранее проведенных нами исследованиях было показано стимулирующее влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на активацию гемопоэза старых лабораторных животных после воздействия экстремальных факторов [1, 2, 3]. Учитывая биологические особенности взаимодействия между ММСК и ГСК представляется интересным изучить влияние сочетанной трансплантации данных видов клеток на активацию гемопоэза старых лабораторных животных.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 90 старых мышцах-самцах в возрасте 20–22 месяцев с массой 35–40 г. Эксперименты по получению гемопоэтических стволовых клеток и культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток выполнены на 28 лабораторных животных мышцах-самцах в возрасте 3–4 месяцев с массой 25–30 г при сроке гестации 14 дней. Старые лабораторные животные были разделены на опытную и контрольную группы. 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 — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после экстремального воздействия однократно. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения и на 1 и 5 сутки после острой кровопотери.

Получение клеточной культуры ММСК и ГСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. При этом мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной обработки ткани плаценты. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам Sca-1 и CD 117. Проточная цитометрия была проведена на цитометре FACScalibur (BD Biosciences, США). В суспензии трансплантируемых клеток оценивалось содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117, Sca-1 и отрицательных по Lin (CD45, C3e, Ly-6G, M1/70, Ter-119). В качестве изотипического контроля для антител при проведении позитивной иммуномагнитной сепарации по Sca-1 и CD117 были использованы антитела PE labeled Rat IgG2a, kappa isotype control (BD Biosciences). С целью определения Lin антигенов на поверхности клеток был использован набор антител — FITC anti-mouse Lineage Cocktail with isotype control (Biolegend, США). Проведенные исследования позволили установить, что содержание клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+ (рис. 1), Sca-1+ (рис. 2), Lin- составило 70–93%. Исследования выполнены на базе ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России. С целью определения функциональной способности клеток, выделенных с помощью позитивной иммуномагнитной сепарации (Sca1+, CD 117+, Lin-) был проведен стандартный тест колониеобразования в метилцеллюлозной среде MethoCult.

Для подтверждения принадлежности культуры к ММСК производилась окраска клеток с помощью набора антител Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США), содержащего позитивные (антитела к integrin β 1, CD 54,

collagen type I and fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45) [8]. Производилась дифференцировка полученной культуры в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95–97%.

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.

Оценка регенераторных процессов в красной и белой пульпе селезенки производилась по определению основных морфометрических показателей и анализе цитограммы данного органа. Были определены следующие показатели:

— площадь лимфоидного фолликула = суммарная площадь лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов;

— площадь В-зоны лимфоидного фолликула = суммарная площадь

В-зоны лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов;

— площадь герминативного центра лимфоидного фолликула = суммарная площадь герминативных центров лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов;

— площадь Т-зоны лимфоидного фолликула = суммарная площадь

Т-зоны лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов;

— расстояние между центрами фолликулов = сумма расстояний между ближайшими фолликулами / количество подсчитанных расстояний. Клеточность красной пульпы определялась как среднее содержание клеток в красной пульпе в $0,01 \text{ мм}^2$.

Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics. Вероятность различий считалась достоверной при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования

При анализе миелограммы, периферической крови, морфометрических и цитологических показателей селезенки старых лабораторных животных на 1 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в физиологических условиях, а также после воздействия ионизирующего излучения отмечено, что изучаемые показатели не отличались от контроля.

В эритроидном диффероне установлено существенное увеличение содержания полихроматофильных нормобластов ($1,13 \pm 0,17$ млн кл./бедро, $p < 0,05$) на 37,04 % по сравнению с контролем. Указанные изменения привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов в костном мозге на 25,8 % ($1,45 \pm 0,18$ млн кл./бедро, $p < 0,05$).

При анализе данных периферической крови отмечено увеличение содержания ретикулоцитов на 20,6 % ($130,67 \pm 7,00$ Г/л, $p < 0,05$) относительно контроля.

В физиологических условиях на 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при проведении морфометрического исследования, анализе клеточного состава селезенки старых лабораторных мышей установлено, что изучаемые показатели существенно не отличались от данных, полученных в группе контроля.

При анализе миелограммы старых животных на 7 сутки после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритро-

индном ростке отмечено увеличение содержания эритробластов на 37,9%, базофильных и полихроматофильных нормобластов соответственно на 42,1% и 32,3% по сравнению с контрольной группой. Указанные изменения привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов на 35,6% (Эр.эл.: $1,11 \pm 0,06$ млн кл./бедро, $p < 0,05$). В гранулоцитарном диффероне выявлено увеличение содержания миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов относительно контроля, увеличилось общее содержание гранулоцитов. При подсчете содержания лимфоцитов в костном мозге у старых животных обнаружено увеличение их содержания на 23,7% (таблица 1).

Таблица 1

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, $M \pm m$, $n=9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн клеток/бедро)	
		NaCl	ММСК и ГСК
Миелокарициты (общее число)		$6,28 \pm 0,72^*$	$7,82 \pm 0,95$
Нейтрофильные клетки	миелобласты	$0,09 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$
	промиелоциты	$0,07 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,02$
	миелоциты	$0,09 \pm 0,02^*$	$0,15 \pm 0,02^{**}$
	метамиелоциты	$0,21 \pm 0,02^*$	$0,26 \pm 0,02^{**}$
	палочкоядерные и сегментоядерные	$3,18 \pm 0,38^*$	$4,13 \pm 0,30^{**}$
Эозинофилы (всех генераций)		$0,09 \pm 0,02^*$	$0,11 \pm 0,02$
Все гранулоцитарные элементы		$3,74 \pm 0,39^*$	$4,86 \pm 0,31^{**}$
Эритробласты		$0,028 \pm 0,005$	$0,04 \pm 0,003^{**}$
Нормобласты	базофильные	$0,19 \pm 0,04^*$	$0,27 \pm 0,02^{**}$
	полихроматофильные	$0,59 \pm 0,07^*$	$0,78 \pm 0,04^{**}$
	оксифильные	$0,01 \pm 0,006$	$0,02 \pm 0,01$
Все эритроидные элементы		$0,82 \pm 0,10^*$	$1,11 \pm 0,06^{**}$
Лимфоциты		$1,90 \pm 0,20^*$	$2,35 \pm 0,35^{**}$
Прочие		$0,19 \pm 0,03^*$	$0,21 \pm 0,02$
Индекс созревания нейтрофилов		$0,15 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,01$
Индекс созревания эритронормобластов		$0,73 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,02$
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		$4,67 \pm 0,89$	$4,37 \pm 0,34$

Примечание: * отличие от группы старых интактных животных, достоверно с $p < 0,05$. ** отличие от контрольной группы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с $p < 0,05$.

Данные периферической крови дополняют и подтверждают ранее выявленные изменения в костном мозге. Так, выявлено увеличение содержания ретикулоцитов, повышение общего содержания лейкоцитов по сравнению с лабораторными животными, которым не проводилась сочетанная трансплантация ММСК и ГСК.

При проведении морфометрических исследований у старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявлено, что площадь лимфоидного фолликула была достоверно меньше значений нормы и достоверно не отличалась от значений в контрольной группе. При анализе площади В-зоны лимфоидного фолликула установлено, что не произошло восстановление изучаемого показателя до значений нормы и он был снижен на 20,4% ($p < 0,05$). Площадь герминативного центра лимфоидного фолликула восстановилась до значений нормы. При анализе площади Т-зоны лимфоидного фолликула отмечено, что значение этого показателя существенно не отличалось от данных в контрольной подгруппе. При анализе расстояния между центрами лимфоидных фолликулов отмечено увеличение данного показателя на 26,1% ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. При анализе плотности клеток в красной пульпе селезенки обнаружен эффект от введения стволовых клеток, что было выражено в увеличении изучаемого показателя на 23,0% по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Таблица 2

Морфометрические параметры селезенки старых мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ($M \pm m$, $n = 9$)

Параметры	Значения	
	NaCl	ММСК и ГСК
Площадь лимфоидного фолликула, ($\text{мкм}^2 \cdot 105$)	$0,45 \pm 0,07^*$	$0,50 \pm 0,05^*$
Площадь В-зоны ($\text{мкм}^2 \cdot 105$)	$0,43 \pm 0,057^*$	$0,44 \pm 0,044^*$
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ($\text{мкм}^2 \cdot 105$)	$0,09 \pm 0,009^*$	$0,10 \pm 0,01$
Площадь Т-зоны ($\text{мкм}^2 \cdot 105$)	$0,045 \pm 0,007^*$	$0,046 \pm 0,005^*$
Расстояние между центрами фолликулов, мкм	$226,71 \pm 3,67^*$	$285,86 \pm 14,20^{**}$
Общая клеточность красной пульпы в $0,01 \text{ мм}^2$	$146,71 \pm 10,82^*$	$180,4 \pm 5,35^{**}$

Примечание: * отличие от группы старых интактных животных, достоверно с $p < 0,05$ ** отличие от контрольной группы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с $p < 0,05$.

При анализе клеточности селезенки старых животных установлено, что данный показатель не восстановился и был снижен на 19,3% ($p < 0,05$). При изучении цитограммы селезенки обнаружено восстановление содержания до значений нормы лимфобластов, что в свою очередь подтверждает данные полученные при определении площади герминативного центра. В то же время следует

отметить, что содержание пролимфоцитов, лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов и моноцитов оставалось меньше значений нормы. При определении количества гранулоцитов установлено восстановление этого показателя до значений нормы. Выраженный эффект от проведенной трансплантации ММСК и ГСК старым лабораторным животным наблюдался при определении количества эритроидных клеток. Их содержание существенно превышало аналогичный показатель в контрольной группе (+19,6%) (таблица 3).

Таблица 3

Клеточный состав селезенки старых мышей на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ($M \pm m$, $n = 9$)

Название клеточных элементов	Содержание клеток, 10^6	
	NaCl	ММСК и ГСК
Общее число клеток	$116,87 \pm 3,21^*$	$123,99 \pm 7,40^*$
Лимфобласты	$1,10 \pm 0,09^*$	$1,21 \pm 0,09$
Пролимфоциты	$4,65 \pm 0,30^*$	$5,17 \pm 0,16^*$
Лимфоциты	$79,17 \pm 3,40^*$	$81,10 \pm 6,91^*$
Плазматические клетки	$0,31 \pm 0,02^*$	$0,32 \pm 0,03^*$
Макрофаги	$3,60 \pm 0,20^*$	$3,67 \pm 0,20^*$
Моноциты	$1,46 \pm 0,04^*$	$1,46 \pm 0,08^*$
Гранулоцитарные клетки	$7,23 \pm 0,31^*$	$8,37 \pm 0,45$
Эритроидные клетки	$14,3 \pm 0,34^*$	$17,10 \pm 0,69^{**}$
Прочие	$5,04 \pm 0,35^*$	$5,59 \pm 0,16$

Примечание: * отличие от группы старых интактных животных, достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от контрольной группы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с $p < 0,05$.

Выводы

Таким образом при сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявлена активация эритропоэза, что можно объяснить способностью ММСК обеспечивать хоуминг как собственных (аутологических), так и трансплантированных (аллогенных) ГСК в соответствующие ниши. Этот механизм реализуется через выработку SDF-1, который взаимодействует со своим рецептором CXCR4 на поверхности ГСК. Процесс приживания ГСК обусловлен способностью ММСК синтезировать компоненты экстрацеллюлярного матрикса (коллаген I, III, IV, V типов, фибронектин, протеогликаны), формирующего костномозговое микроокружение, необходимое клеткам гемопоэза. Синтез ММСК таких факторов как SCF, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-11 обеспечивает пролиферацию и дифференцировку стволовых гемопоэтических клеток и клеток предшественников в эритроидном направлении. Активацию гранулоцитопоэза можно объяснить способностью трансплантированных ММСК вырабатывать такие факторы как ГМ-КСФ, Г-ГСК, которые регулируют дифференцировку ГСК в гранулоцитарном направлении. Указанные свойства ММСК в совокупности с их иммуносупрессивными свойствами (синтез ПГ E2, TGF- β) обеспечивают активацию гранулоцитопоэза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гребнев Д.Ю. Перспектива применения сочетанной трансплантации стволовых клеток для восстановления гемопоэза. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012. № 3 (40). С. 67-68.
2. Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Ястребов А.П. Влияние различных доз ГСК при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани после воздействия ионизирующего излучения. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2014. № 5. С. 73-75.
3. Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Ястребов А.П. Перспектива использования стволовых клеток для активации кроветворения в условиях возрастной инволюции на фоне воздействия ионизирующего излучения. Успехи Геронтологии. – 2014. – Т. 27, № 2. – С. 348–352.
4. Сазонов С.В. Т-лимфоциты регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор). Вестник Уральской медицинской академической науки. 2007. № 1: С. 91.
5. Сазонов С.В. Особенности состояния пролиферативных процессов в условиях возрастной инволюции организма. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Челябинск, 1999.
6. Benito A.I., M.A. Diaz, M. Gonzalez-Vicent, J. Sevilla, L. Madero Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical result. Bone Marrow Transplantation. - 2004. – -Vol. 33: P. 675 - 690.
7. Mikkola, H.K., Gekas C., Orkin S.H. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. Experimental Hematology. – 2005. – Vol. – 33: P.1048-1054.
8. Patel D.M., Shah J., Srivastava A.S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. Stem Cells International. – 2013. – Vol. 2013: P.15.