

*Гребнев Д.Ю.,
Маклакова И.Ю., Осипенко А.В.*

ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕЛЕЗЕНКИ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИОЗЛУЧЕНИЯ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Россия
Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Россия

Резюме. Проведены экспериментальные исследования по изучению влияния сочетанной трансплантации плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток на морфометрические показатели селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения. После воздействия ионизирующего излучения на фоне введения стволовых клеток отмечено увеличение размеров лимфоидного фолликула за счет увеличения площади В-зоны фолликула. Также установлено увеличение плотности клеток в красной пульпе селезенки за счет повышения содержания эритроидных элементов и лейкоцитов, увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки, ионизирующее излучение, регенерация, селезенка, морфометрические показатели

На сегодняшний день актуальной является проблема поиска факторов, способных активировать регенерацию тканей в условиях повреждения [2, 3, 5]. Воздействие ионизирующего излучения (ИИ) реализует свое повреждающее действие преимущественно в быстрообновляющихся тканях [1]. В настоящее время идет активный **поиск источников**, которые бы позволили получить большее количество стволовых клеток, обладающих повышенным пролиферативным потенциалом и пролиферативной активностью [7]. Таким источником является плацента [4, 6, 8]. Целью настоящего исследования явилось изуче-

ние влияния плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на морфометрические показатели селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения.

Эксперименты выполнены на 48 белых лабораторных мышьях-самцах возраста 4–6 месяцев, массой 22 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены на 8 лабораторных животных мышьях-самцах возраста 3–4 месяца, массой 22 г, срок гестации 14 дней. 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. Для подтверждения принадлежности культуры к ММСК производилась идентификация клеток с помощью набора антител Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit, содержащего позитивные (антитела к integrin $\beta 1$, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45). Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95–97%. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 и CD 117. Проточная цитометрия была проведена на цитометре FACSCalibur. 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. С целью определения Lin антигенов на поверхности клеток был использован набор антител — FITC anti-mouse Lineage Cocktail with isotype control. Проведенные исследования позволили установить, что содержание клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 70–93%.

Изучалось воздействие ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр на лабораторных животных зрелого возраста, были выделены опытная и контрольная подгруппы. Контрольную группу составили животные, не подвергшиеся облучению. Животным опытной подгруппы внутривенно вводилась суспензия ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн кл/кг и 330 тыс. кл./кг, контрольной подгруппе вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после облучения однократно. За-

бой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения. Оценка регенераторных процессов в красной и белой пульпе селезенки производилась по определению основных морфометрических показателей органа: 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 определялось как среднее содержание клеток в красной пульпе в $0,01 \text{ мм}^2$.

В физиологических условиях на 1 и 7 сутки после сочетанной трансплантации стволовых клеток изучаемые показатели достоверно не отличались от контроля.

На 1 сутки после воздействия ИИ на фоне введения ММСК и ГСК обнаружено увеличение клеточности красной пульпы по сравнению с контрольной подгруппой.

При проведении морфометрических исследований в селезенке на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток установлено увеличение площади лимфоидного фолликула на 14,6% по сравнению с контролем. При этом данный показатель восстановился до значений нормы. Обнаружено увеличение площади В-зоны фолликула после введения клеток на 22,1%, тогда как при анализе площади Т-зоны в опытной подгруппе выявлено отсутствие эффекта от трансплантации стволовых клеток. Кроме того, установлено увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов на 11%, увеличение плотности клеток красной пульпы на 19%, увеличение содержания эритроидных элементов в красной пульпе относительно контрольной подгруппы на 24,6%. Однако этого было недостаточно для восстановления содержания эритроцитов в красной пульпе до значений нормы. Отмечено также увеличение содержания клеток белой крови в красной пульпе на 33% по сравнению с контрольной подгруппой (таблица 1).

Таблица 1
Морфометрические параметры селезенки мышей, $M \pm m$, $n=9$

Параметры	1 сутки после воздействия ИИ		7 сутки после воздействия ИИ	
	Введение 0,9% NaCl.	Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК	Введение 0,9% NaCl.	Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК
Площадь лимфоидного фолликула, ($\text{мкм}^2 \cdot 10^5$)	0,71±0,04*	0,71±0,03*	0,89±0,08*	1,02±0,07**
Площадь В-зоны ($\text{мкм}^2 \cdot 10^5$)	0,70±0,03*	0,72±0,054*	0,79±0,08*	0,97±0,074**
Площадь Т-зоны ($\text{мкм}^2 \cdot 10^5$)	0,067±0,006*	0,063±0,01*	0,07±0,07*	0,067±0,0079*
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	279,43±11,80*	275,14±10,16*	304,57±10,33	338,00±6,86*; **
Общая клеточность красной пульпы в 0,01 мм ²	175,43±8,20*	200,29±7,76*; **	186,71±5,47*	224,57±6,65*; **
Содержание эритроцитов в красной пульпе в 0,01 мм ²	102,14±9,88*	110,14±9,02*	105,43±7,06*	131,71±5,76*; **
Содержание лейкоцитов в красной пульпе в 0,01 мм ²	69,29±5,18*	75,43±5,10*	76,00±6,57*	94,71±5,39*; **

Примечание: * отличие от группы интактных животных (контрольная группа), достоверно с $p < 0,05$. ** отличие от подгруппы интактных животных после острой кровопотери (контрольная подгруппа), достоверно с $p < 0,05$.

Таким образом, проведенные исследования по изучению действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявили наличие определенных изменений в селезенке. Эти изменения были выражены в увеличении размеров лимфоидного фолликула за счет увеличения площади В-зоны фолликула. Однако, в изучаемые сроки еще не происхо-

дит восстановления данных показателей до значений нормы. На фоне трансплантации стволовых клеток в условиях воздействия ИИ происходит увеличение плотности клеток в красной пульпе селезенки и, как следствие увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. В свою очередь увеличение плотности клеток происходит как за счет увеличения содержания эритроцитов, так и за счет увеличения содержания лейкоцитов.

Выявленные изменения могут быть обусловлены способностью ММСК вырабатывать антиапоптогенные факторы (HIF-1 α), а также стимулировать экспрессию этих факторов другими клетками. Другой механизм действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК может быть обусловлен стимулирующим действием на гемопоэз в миелоидной ткани. Способность ММСК к выработке хемоаттрактанта для аллогенных и аутологичных ГСК (SDF-1) может усиливать миграцию последних в селезенку и индуцировать, таким образом, формирование различных типов колоний. Восстановление содержания клеточного состава крови и последующая миграция этих элементов в селезенку может способствовать восстановлению клеточного состава органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маклакова И.Ю., Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю. Изменение морфометрических и цитологических показателей селезенки при острой кровопотере на фоне введения стволовых клеток. Успехи Геронтологии. 2015. Т.28, № 2. С. 218–221.

2. Сазонов С.В. Т-лимфоциты – регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор). Вестник Уральской медицинской академической науки. 2007. № 1. С. 91.

3. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Стволовые клетки, их свойства, источники получения и роль в регенеративной медицине. Екатеринбург: УГМУ 2016. 272 с.

4. Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П., Маклакова И.Ю. Изменения морфометрических показателей селезенки старых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения на фоне трансплантации стволовых клеток. Казанский медицинский журнал. 2013. Т. 94. № 6: С. 911-914.

5. Caplan A.I. Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell Biochem. 2006; 98:1076-84.

6. Шахпазян Н.К. Сравнение биологических свойств мультипо-

тентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и плаценты для клинического применения / Н.К. Шахпазян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева, А.Е. Гомзяков, Н.А. Новоселова, Я.А. Круглова, Е.В. Боякова, Б.Л. Лазебник, О.В. Князев, Е.В. Скоробогатова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 2. – С.53-54.

7. Alvares-Silva M. Mouse placenta is a major hematopoietic organ / M. Alvares-Silva, P. Belo – Diabangouaya, J. Salaun, F. Dieterlen –Lievre // *Developmental Cell*. – 2003. – P.5437 – 5444.

8. Pilz, G.A. Human term placenta – derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow – derived mesenchymal stromal cells / G.A. Pilz, C. Ulrich, M. Ruh // *Stem Cells and Development*. – 2011. – Vol. 20, № 4. – P.635 – 646.