

На правах рукописи

ГРЕБНЕВ

Дмитрий Юрьевич

**ВЛИЯНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОЦЕССЫ
РЕГЕНЕРАЦИИ БЫСТРООБНОВЛЯЮЩИХСЯ ТКАНЕЙ ПРИ
СТАРЕНИИ И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ
ФАКТОРОВ**

14.03.03 — Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Екатеринбург-2015

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

член-корр. РАН, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор **ЯСТРЕБОВ Анатолий Петрович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга **ЖДАНОВ Вадим Вадимович**

доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России **САМОДЕЛКИН Евгений Иванович**

доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» **СЕМЧЕНКО Валерий Васильевич**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2015 г. в ___ ч. на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 208.102.03, созданного на базе ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028, Екатеринбург, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке имени В.Н. Климова ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17, с авторефератом на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: www.vak2.ed.gov.ru и на сайте университета: www.usma.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор



БАЗАРНЫЙ
Владимир Викторович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Проблема клеточного восстановления после воздействия повреждающего фактора продолжает оставаться актуальным вопросом современной биологии и медицины (А. М. Дыгай и соавт., 2012; А. П. Ястребов и соавт., 1988). Известно, что активация компенсаторно-приспособительных механизмов после воздействия экстремальных факторов на организм может приводить к восстановлению специфических функций, выполняемых данной тканью (А. В. Осипенко и соавт., 1996; П. Д. Горизонтов и соавт., 1983).

Особый интерес представляет изучение восстановления функции быстрообновляющихся тканей, поскольку именно такие ткани нуждаются в поддержании высокого пролиферативного потенциала (С. В. Сазонов, 1999). Известно, что при старении происходит прогрессирующее уменьшение содержания стволовых клеток в организме (В. Н. Анисимов, 2008; Y. Kong et al., 2012; A. Sharman et al., 2011). Также известно, что в ранние сроки после воздействия экстремальных факторов происходит существенное снижение скорости клеточного обновления быстрообновляющихся тканей (С. П. Ярмоненко и соавт., 2004). При этом восстановление регенерации обеспечивается обладающими высоким пролиферативным потенциалом сохранившимися стволовыми клетками. Восполнение пула стволовых клеток в физиологических условиях, а также после действия экстремальных факторов представляется перспективным в плане активации регенерации тканей (Т. В. Шаманская и соавт., 2010; Э. Глюкман, 2011; О. Г. Макеев и соавт., 2013; Б. Г. Юшков и соавт., 2013).

Одна из основных целей регенеративной медицины — понять механизмы, по которым трансплантация клеток с высоким регенераторным потенциалом приводит к регенерации поврежденных тканей (А. Ф. Повещенко и соавт., 2013; В. Galliot et al., 2010). Эти механизмы реализуются на основе пластичности трансплантированных клеток, слияния с клетками реципиента, паракринными

механизмами, через формирование межклеточных контактов (И. Л. Чертков и соавт., 2005; M. E. Christensen et al., 2010). Существенное значение имеет способность трансплантированных клеток изменять хоуминг и формировать «ниши» для стволовых клеток (Н. С. Жуковский, и соавт., 2011; S. Filip et al., 2012).

Накоплен значительный экспериментальный материал, доказывающий способность мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) к трансдифференцировке. В ряде исследований показана способность ММСК дифференцироваться в клетки энтодермального и эктодермального происхождения, включая нейроны, гепатоциты (D. Cizkova et al., 2011; L. Ferroni et al., 2013). Трансплантация ММСК способна ускорить процесс приживания ГСК и, соответственно, процесс восстановления регенерации тканей (D. Jing et al., 2010). Эффективность применения ММСК в качестве котрансплантата при введении ГСК обусловлена тем, что они вырабатывают цитокины и факторы роста, необходимые для хоуминга и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток (D. J. Kavanagh et al., 2011). ММСК синтезируют компоненты матрикса, в том числе фибронектин, ламинин, коллаген и протеогликаны. При этом ММСК способны дифференцироваться в клетки стромы, которая обеспечивает синтез экстрацеллюлярного матрикса, формирующего микроокружение, необходимое для пролиферации и дифференцировки стволовых клеток (A. Chow et al., 2011; E. Jones et al., 2011). Кроме того, ММСК обладают свойством продуцировать противовоспалительные цитокины, а также обеспечивать стимуляцию ангиогенеза (H. Kavanagh et al., 2011; S. Kidd et al., 2010).

Актуальным является поиск таких тканей, которые бы являлись богатым источником стволовых клеток с высоким пролиферативным потенциалом (В. А. Шаблий и соавт., 2012; D. M. Patel et al., 2013). В этом отношении интерес представляет плацентарная ткань, получение которой возможно неоперативным путем и лишенным этических проблем. Учитывая низкую иммуногенность клеток фетальных тканей, а также возможность выделения достаточного

количества ГСК и ММСК из плаценты, этот орган представлялся перспективным в плане выделения из него указанных видов клеток (В. Б. Сериков и соавт., 2008; А. И. Уфимцева и соавт., 2013).

Способность ММСК оказывать иммуносупрессивное действие может обеспечить приживание аллогенного трансплантата (А. Aldinucci et al., 2010; А. Gebler et al., 2012; Z. Han et al., 2012). Выделение ММСК хемоаттрактантов для ГСК обеспечивает направленный хоуминг ГСК, а формирование соответствующего микроокружения дополнительно улучшает приживание трансплантированных аллогенных ГСК (Y. Zhang et al., 2004, С. Jorgensen et al., 2010).

Несмотря на значительное количество публикаций, посвященных изучению действия стволовых клеток, остается неизученной возможность использования аллогенной сочетанной трансплантации стволовых клеток, выделенных из плаценты, для активации регенерации быстрообновляющихся тканей в условиях старения организма, а также в условиях действия экстремальных факторов.

Все изложенное выше явилось основанием для постановки цели и задач настоящего исследования.

Цель исследования

Изучить влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов.

Задачи исследования:

1. Усовершенствовать методику выделения гемопоэтических стволовых клеток из ткани плаценты методом позитивной иммуномагнитной сепарации.

2. Определить минимальную эффективную дозу ГСК при проведении сочетанной трансплантации с ММСК в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов.

3. Исследовать влияние сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на содержание цитогенетически измененных клеток с учетом возрастных изменений в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов.

4. Исследовать возрастные особенности регенерации быстрообновляющихся тканей в физиологических условиях после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.

5. Оценить возможность активации регенерации быстрообновляющихся тканей при старении после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.

6. Изучить влияние сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей после острой кровопотери с учетом возрастных особенностей.

Научная новизна исследования

В настоящем исследовании впервые изучено влияние аллогенной сочетанной трансплантации стволовых клеток (ММСК и ГСК), выделенных из плаценты, на регенерацию быстрообновляющихся тканей в физиологических условиях, а также после воздействия экстремальных факторов. Проведенные экспериментальные исследования позволили определить минимальную эффективную дозу ГСК при проведении сочетанной трансплантации с ММСК — 330 тыс. клеток/кг.

Показано, что в физиологических условиях при старении организма сочетанная трансплантация ММСК и ГСК приводит к уменьшению содержания цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани, а также к снижению выраженности апоптоза в эпителии тощей кишки. Доказана способность сочетанной трансплантации активировать эритропоэз как в зрелом, так и в

старом организме. Установлена способность сочетанной трансплантации ММСК и ГСК увеличивать количество клеток в криптах слизистой оболочки тощей кишки. При этом механизм данного увеличения у зрелых и старых животных существенно отличается. В зрелом организме увеличение количества эпителиоцитов крипт обусловлено стимуляцией пролиферативной активности, в то время как в старом организме — ингибированием выраженности апоптоза.

Впервые получены новые оригинальные данные о влиянии сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей в условиях воздействия ионизирующего излучения, а также после острой кровопотери, что дало основание для получения соответствующих патентов. Показано, что уже в ранние сроки после воздействия экстремальных факторов сочетанная трансплантация ММСК и ГСК у старых и зрелых лабораторных животных вызывает снижение содержания цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани, а также приводит к активации эритропоэза и гранулоцитопоэза.

Впервые доказано, что механизмы регенерации красной и белой пульпы селезенки у зрелых и старых животных после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК имеют свои особенности. У зрелых животных в этих условиях происходит восстановление морфометрических и цитологических показателей белой и красной пульпы, в то время как у старых трансплантация ММСК и ГСК вызывает преимущественно активацию регенерации красной пульпы.

Впервые установлено, что в слизистой оболочке тощей кишки данная трансплантация клеток в условиях воздействия экстремальных факторов приводит к увеличению клеточной популяции крипт. Но механизм этих изменений, как и в физиологических условиях, различный. У зрелых животных после воздействия ионизирующего излучения увеличение клеточной популяции крипт обусловлено стимуляцией пролиферативной активности клеток и угнетением выраженности апоптоза, в то время как в старом

организме этот результат был достигнут за счет снижения апоптоза эпителиоцитов крипт.

Впервые обнаружены различия в механизмах действия сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на регенерацию красной и белой пульпы селезенки обеих возрастных групп после острой кровопотери. У зрелых животных происходит восстановление клеточности красной пульпы за счет увеличения содержания гранулоцитов и эритроидных клеток, при этом в белой пульпе уменьшается общая площадь лимфоидных фолликулов, размеры В-зоны и герминативного центра лимфоидных фолликулов. Эти изменения со стороны лимфоидной ткани обусловлены уменьшением количества лимфобластов и пролимфоцитов. В то же время у старых животных в силу менее выраженной способности КОЕс к хоумингу в белой пульпе подобный эффект не развивается, а восстановление красной пульпы ограничено увеличением содержания преимущественно эритроидных клеток.

Полученные данные о влиянии сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на быстрообновляющиеся ткани свидетельствуют о различном механизме восстановления регенерации в зависимости от возраста, а также вида воздействия.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые разработана и обоснована концепция использования аллогенной сочетанной трансплантации плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток для активации регенерации быстрообновляющихся тканей в условиях старения организма, а также после действия экстремальных факторов. Разработаны новые методические подходы по выделению гемопоэтических стволовых клеток из плаценты и культивированию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Полученные данные свидетельствуют, что плацента может быть важным источником получения стволовых клеток. Доказано, что выделенные из хориона плаценты лабораторных животных мультипотентные

мезенхимальные стромальные клетки и гемопоэтические стволовые клетки реализуют свое действие на быстрообновляющиеся ткани в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов через разные механизмы. Установлено восстановление регенерации быстрообновляющихся тканей после трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток как у зрелых, так и у старых лабораторных животных. Выявлены особенности регенерации быстрообновляющихся тканей в зависимости от вида экстремального фактора. Разработана схема влияния сочетанной трансплантации плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию быстрообновляющихся тканей.

Результаты проведенного исследования внедрены в практику работы лаборатории антивозрастных технологий, лаборатории патоморфологии Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (главный врач — д.м.н., профессор С.Л. Леонтьев), бактериологической лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Свердловской области «Свердловский областной клинический психоневрологический госпиталь для ветеранов войн (начальник госпиталя — Р.В. Соловьев), в практику работы клинико-биохимической лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Уральский Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. В.Д. Чаклина» Министерства здравоохранения РФ (директор — д.м.н. И.Л. Шлыков).

Результаты работы используются также в учебном процессе кафедр патологической физиологии и гистологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (ректор — д.м.н., профессор С.М. Кутепов).

Проведенные исследования легли в основу получения следующих патентов на изобретение и на промышленный образец: «Способ оценки активности миелоидного дифферона» (№ 2312349, зарегистрирован в государственном реестре РФ 10.12.2007), «Способ снятия клеток с культуральной поверхности при проведении пассажа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток» (№ 2391400, зарегистрирован в государственном реестре РФ 10.06.2010), «Способ восстановления миелоидной ткани старых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения» (№ 2394585, зарегистрирован в государственном реестре РФ 20.07.2010), «Способ восстановления эпителия тощей кишки лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения» (№ 2415476, зарегистрирован в государственном реестре РФ 27.03.2011), «Схема влияния трансплантации ММСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и при воздействии экстремальных факторов» (№ 80507, зарегистрирован в государственном реестре РФ 16.12.2011), «Способ выделения гемопоэтических стволовых клеток методом иммуномагнитной сепарации» (№ 2481396, зарегистрирован в государственном реестре РФ 10.05.2013), «Способ выделения гемопоэтических стволовых клеток» (№ 2474610, зарегистрирован в государственном реестре РФ 10.02.2013), «Схема влияния сочетанной трансплантации стволовых клеток на быстрообновляющиеся ткани» (№ 87339, зарегистрирован в государственном реестре РФ 16.12.2013), Схема активации регенерации тканей с помощью стволовых клеток (№ 87338, зарегистрирован в государственном реестре РФ 08.11.2013).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях у зрелых и старых лабораторных животных вызывает активацию эритропоэза. При этом у старых лабораторных животных

в отличие от зрелых животных происходит снижение содержания цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани.

2. Сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК в условиях воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери у зрелых и старых животных приводит к активации эритропоэза и гранулоцитопоэза, а также к снижению количества цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани.

3. Механизм активации регенерации эпителия тощей кишки у зрелых и старых животных после сочетанной трансплантации клеток различный. В физиологических условиях увеличение клеточности крипты у зрелых животных обеспечивается повышением пролиферативной активности клеток, в то время как у старых — ингибированием апоптоза. В условиях воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери у зрелых животных увеличение клеточности крипты реализуется через повышение пролиферативной активности и ингибирование апоптоза эпителиоцитов, а у старых — через снижение выраженности запрограммированной клеточной гибели.

4. Механизм восстановления морфометрических и цитологических показателей селезенки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК после воздействия экстремальных факторов у зрелых и старых животных отличается и зависит от вида экстремального фактора. У зрелых животных после воздействия ионизирующего излучения происходит восстановление морфометрических и цитологических показателей белой и красной пульпы селезенки, у старых животных отмечено восстановление изучаемых показателей красной пульпы селезенки.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в проведенное исследование заключается в разработке необходимых методологических подходов, сборе необходимого фактического материала с последующим анализом, интерпретацией

полученных результатов исследований, статистической обработкой полученных данных и подготовке публикаций. Результаты работы доложены автором на всероссийских и международных симпозиумах и конгрессах.

Апробация результатов диссертации

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на Симпозиуме «Фундаментальные вопросы гематологии. Достижения и перспективы» (г. Екатеринбург, 2010), Школе-конференции для молодых ученых «Клеточные технологии для регенеративной медицины» (г. Санкт-Петербург, 2011), VI конгрессе патофизиологов Украины с международным участием «От экспериментальных исследований к клинической патофизиологии» (Украина, г. Мисхор, 2012), V Ежегодном Международном симпозиуме «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (г. Москва, 2012), III Съезде геронтологов и гериатров России (г. Новосибирск, 2012), Научно-практической конференции и школе, посвященной памяти академика В.В. Фролькиса «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Украина, г. Киев, 2013), 20-м Международном конгрессе геронтологов и гериатров (Корея, г. Сеул, 2013), Российской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и клинической лабораторной диагностики», посвященной памяти академика АН РТ профессора Д.М. Зубаирова (г. Казань, 2013), VI Ежегодном Международном симпозиуме «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (г. Москва, 2013), Научной конференции с международным участием: «Фундаментальные проблемы геронтологии и гериатрии» (г. Санкт-Петербург, 2014), III Межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии практическому здравоохранению» (г. Екатеринбург, 2014).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 34 научных работы, в том числе 14 публикаций — в печатных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных материалов кандидатских и докторских диссертаций, 3 публикации — в зарубежной печати.

По теме диссертации получено 6 патентов на изобретение и 3 патента на промышленный образец.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 301 странице и состоит из введения, 6 глав, общего заключения, выводов, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 110 таблицами, 58 рисунками. Список литературы включает 426 источников, из которых 107 отечественных и 319 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Общая характеристика лабораторных животных

Эксперименты выполнены на 162 зрелых лабораторных мышах-самцах в возрасте 3-4 месяцев с массой 25-30 г и 108 старых мышах-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 58 лабораторных животных мышах-самках в возрасте 3-4 месяцев с массой 25-30 г при сроке гестации 14 дней. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария при естественном освещении и сбалансированном рационе.

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 — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после экстремального воздействия однократно в указанных выше дозах. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения и на 1 и 5 сутки после острой кровопотери.

С целью определения минимальной эффективной дозы ГСК при сочетанной трансплантации с ММСК (6 млн. клеток/кг.) изучалось влияние ГСК в количестве 250 тыс. клеток/кг, 300 тыс. клеток/кг, 330 тыс. клеток/кг на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных в физиологических условиях, а также в условиях действия экстремальных факторов.

Клеточные культуры

Получение клеточной культуры ММСК и ГСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. При этом мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной (раствор аккутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты.

Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 (StemCell Technologies, США) и CD 117 (StemCell Technologies, США) (X. Munira et al., 2009).

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, С3е, 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.

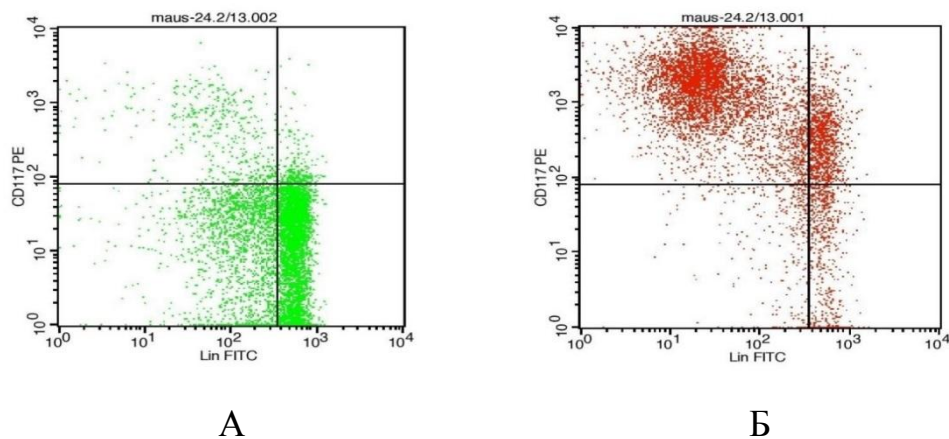


Рис. 1. Результаты проточной цитофлуориметрии. Количество CD117⁺, Lin⁻ клеток, выделенных из хориона плаценты. А — до позитивной иммуномагнитной сепарации (5,8 %), Б — после иммуномагнитной сепарации (70,0 %)

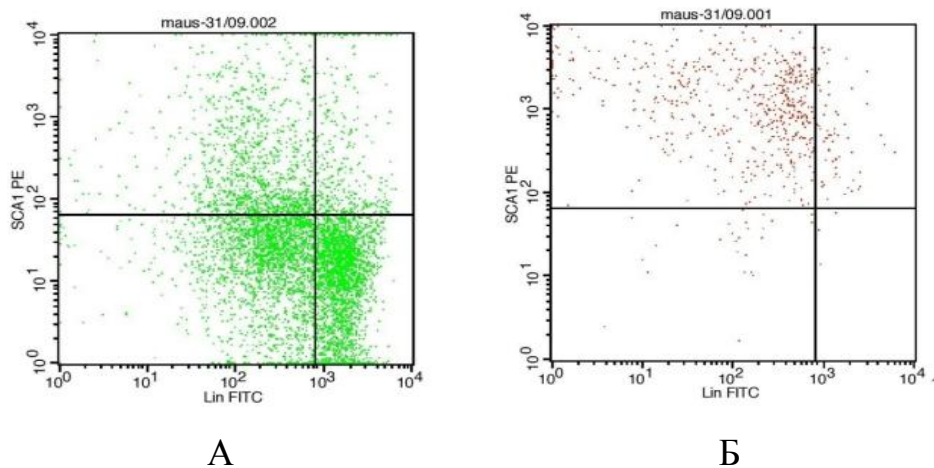
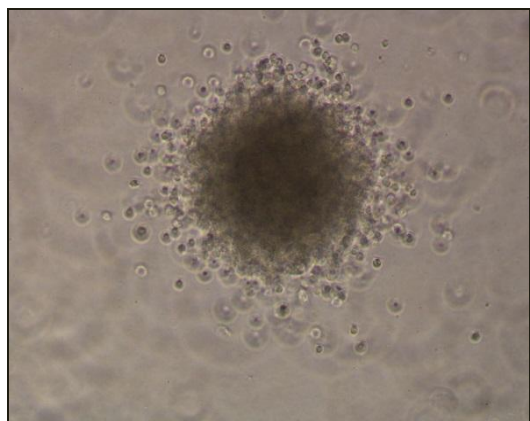


Рис. 2. Результаты проточной цитофлуориметрии. Количество SCA-1⁺, Lin⁻ клеток, выделенных из хориона плаценты. А — до позитивной иммуномагнитной сепарации (18,9 %), Б — после иммуномагнитной сепарации (85,6 %)

Тест колониобразования. С целью определения функциональной способности клеток, выделенных с помощью позитивной иммуномагнитной сепарации (Sca1⁺, CD 117⁺, Lin⁻) был проведен стандартный тест

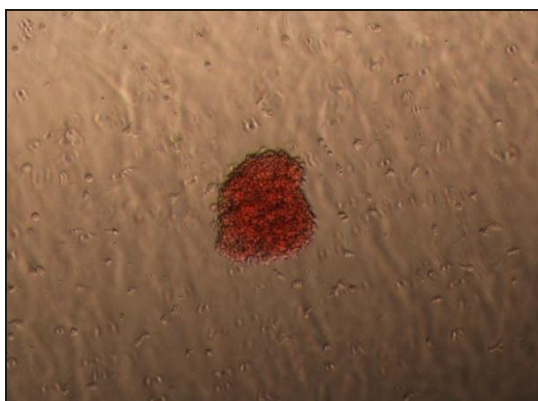
колониобразование в метилцеллюлозной среде MethoCult (StemCell Technologies, Канада). Данный тест позволяет установить способность полученных клеток формировать различные типы гемопоэтических колоний (рис. 3). Образование колоний было зарегистрировано под инвертированным микроскопом Unico (США).



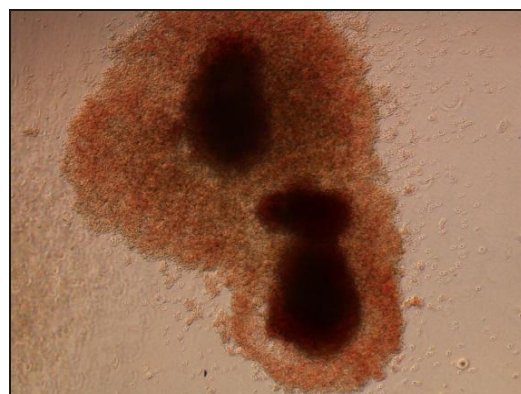
А



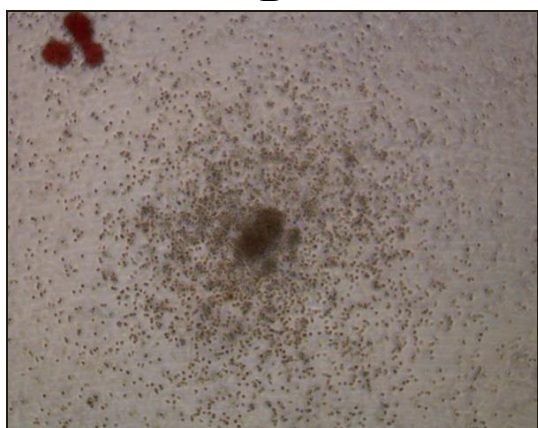
Б



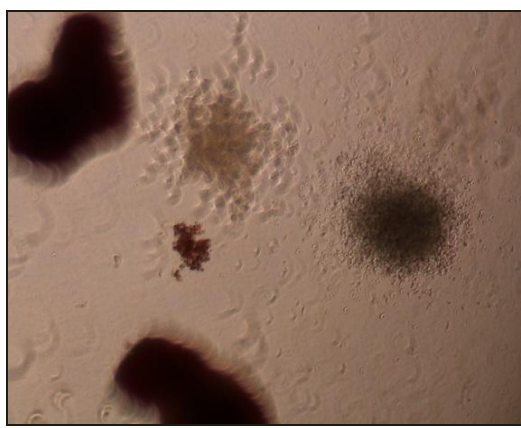
В



Г



Д



Е

Рис. 3. Колониобразование в метилцеллюлозной среде, 14-е сутки культивирования. А — КОЕ- М; Б — КОЕ- ГМ; В — БОЕ- Е; Г — КОЕ- ГЭММ (два центра); Д — два типа колоний: БОЕ-Е, КОЕ- ГМ (в центре); Е — три типа колоний: 2 БОЕ-Е (большие), 1 (маленькая в центре) БОЕ-Е, КОЕ-М (в центре), КОЕ- ГМ (справа). Ув. х 100

Культура ММСК. С целью получения первичной культуры ММСК осуществлялся пассаж моноклеарной фракции клеток, выделенной из ткани плаценты, в специализированной среде для культивирования ММСК в чашки Петри в концентрации 1×10^6 клеток на 1 см^2 . Культивирование ММСК проводилось в условиях CO_2 — инкубатора при температуре $37 \text{ }^\circ\text{C}$ с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Через 24-48 часов инкубации не прикрепленные к дну чашки Петри клетки аспирировали. Среду для культивирования ММСК добавляли к прикрепленным к пластику клеткам. Замена среды проводилась каждые 3-4 сутки до достижения клетками 70-80 % конфлюэнтности. При формировании соответствующего монослоя осуществлялся пересев клеток.

При трансплантации лабораторным животным была использована культура ММСК третьего пассажа.

Иммуноцитохимия. 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 $\beta 1$, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45).

Производилась дифференцировка полученной культуры в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Состав среды, индуцирующей дифференцировку: MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement («StemCell Technologies», Канада) / MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement («StemCell Technologies», Канада) и MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) («StemCell Technologies», Канада) в соотношении 1:4, 2 ммоль раствора L-глутамин («StemCell Technologies», Канада). Факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция. Способность клеток дифференцироваться в адипоцитарном направлении подтверждена гистохимическим методом регистрации липидных вакуолей, окрашивающихся

красителем Oil Red O (J. J. Minguell et al., 2004). Настоящие исследования выполнены на базе ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий».

Подсчет и определение жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего. Подсчет клеток производился в 5 больших квадратах камеры Горяева (или ≥ 100 клеток). Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95-97%.

Экстремальные воздействия

Облучение животных проводилось на гамма-терапевтической установке типа АГАТ – С с радионуклидным источником ^{60}Co , поглощенная доза составила 4,0 Гр, мощность поглощенной дозы 20 сГр/мин.

Острая кровопотеря была вызвана кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2 % от массы тела животного.

Исследование кроветворной ткани

Морфологическое исследование крови и костного мозга. Кровь для исследования брали у мышей из хвостовой вены. Подсчет количества лейкоцитов проводили в счетной камере Горяева. При определении числа ретикулоцитов их подсчитывали в окрашенных бриллиант — крезил — блау мазках крови на 2000 эритроцитов. Мазки периферической крови окрашивали по Романовскому. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили на 200 клеток. (В. В. Меньшиков и соавт., 1994).

Для исследования морфологии костного мозга его извлекали из бедренной кости. Определяли общее количество миелокариоцитов в костном мозге бедренной кости. Мазки костного мозга окрашивали по Паппенгейму. Подсчет миелограммы производили на 1000 клеток. Пролиферативную активность эритроидного и гранулоцитарного ростков оценивали с помощью определения митотического индекса (МИ) соответствующих дифферонов.

Микроядерный тест (МЯТ) был рассчитан как отношение числа полихроматофильных эритроцитов с микроядрами к 1000 подсчитанных полихроматофильных эритроцитов (Методические рекомендации по оценке мутагенной активности химических веществ микроядерным тестом, подготовлены Всесоюзным научно-исследовательским институтом дезинфекции и стерилизации Министерства здравоохранения СССР, Москва 1984).

Морфологическое исследование селезенки. Оценка регенераторных процессов в красной и белой пульпе селезенки производилась по определению основных морфометрических показателей и анализе цитограммы данного органа. Для проведения гистологического исследования селезенки были изготовлены гистологические препараты органа толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование проводили с использованием программы Biovision 4.0.

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 определялось как среднее содержание клеток в красной пульпе в $0,01 \text{ мм}^2$.

Для каждого лабораторного животного было проведено по 10 измерений в случайно выбранных срезах из разных отделов органа.

Окраска цитологических мазков селезенки проводилась по методу Паппенгейма. Данные исследования выполнены на базе ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России.

Препараты были исследованы с помощью микроскопа Micros MC-50 (Австрия), фоторегистрацию осуществляли цифровой камерой cam V400.

Морфологическое исследование эпителия тощей кишки

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 (В. А. Труфакин и соавт., 1990).

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 AporTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) (Millipore, США). Апоптотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу подсчитанных эпителиоцитов.

Гистологические препараты тощей кишки анализировались с помощью микроскопа Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведено по критерию Манна-Уитни (U). В некоторых случаях для вычисления статистической значимости полученных результатов использовался критерий хи-квадрат (χ^2). Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Вероятность различий считалась достоверной при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить особенности процессов регенерации в миелоидной ткани, эпителии кишечника, красной и белой пульпе селезенки в физиологических условиях и после воздействия экстремальных факторов.

Было изучено действие следующих доз ГСК, вводимых совместно с ММСК: 250 тыс. клеток/кг, 300 тыс. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг. Экспериментальным путем было доказано, что минимальная эффективная доза ГСК, обеспечивающая усиление регенерации быстрообновляющихся тканей при сочетанном введении с ММСК, составляет 330 тыс. клеток/кг. Следует отметить, что эффект от трансплантации определяется не только количеством введенных клеток, но и зависит от условий, в которых проводится их введение. Выполненные исследования на животных зрелого возраста позволили установить, что доза ГСК 250 тыс. клеток/кг при совместном введении с ММСК не оказывает существенного влияния на гемопоэз. ГСК в количестве 300 тыс. клеток/кг при сочетанной трансплантации с ММСК в условиях воздействия ионизирующего излучения (ИИ) обуславливают повышение митотической активности клеток эритроидного и гранулоцитарного ростков. После острой кровопотери трансплантация ММСК и ГСК (300 тыс. клеток/кг) в костном мозге вызывает увеличение пролиферативной активности в эритроидном ростке. В физиологических условиях митотическая активность клеток изучаемых дифферонов в костном мозге при вышеуказанных дозах оставалась без изменений. Введение ГСК в дозе 330 тыс. клеток/кг вызывает изменения в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремального фактора. В физиологических условиях помимо пролиферативного ответа на трансплантацию ММСК и ГСК увеличивается общее количество эритроидных клеток, что свидетельствует об активации эритропоэза. После воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери эффект от введенных клеток более выраженный. В этом случае активизируется и эритропоэз, и гранулоцитопоэз. Различный механизм действия сочетанной трансплантации

ММСК и ГСК в зависимости от условий их введения определяется свойствами этих клеток. Именно под действием провоспалительных факторов ММСК способны существенно увеличивать выработку хемоаттрактанта для ГСК – SDF-1 (stromal derived factor-1) и значительно увеличивать на своей поверхности количество молекул адгезии для ГСК. Также под действием провоспалительных факторов ММСК индуцируют выработку белков теплового шока в клетках, что обеспечивает их выживание. Оказывая иммуносупрессивное действие, усиливая миграцию, формируя микроокружение для ГСК, ММСК способны обеспечивать эффект при меньших вводимых дозах гемопоэтических стволовых клеток относительно их введения без ММСК.

С возрастом происходят не только количественные, но и качественные изменения со стороны стволовых клеток. При старении способность стволовых клеток к самообновлению и дифференцировке снижается. Это ведёт, с одной стороны, к истощению пула стволовых клеток, а с другой — к уменьшению количества выделяемых ими факторов. В связи с этим представлялось важным изучить возможность активации регенерации тканей не только в условиях воздействия на организм экстремальных факторов, но и при старении.

В настоящем исследовании после определения минимальной эффективной дозы ГСК при сочетанном введении с ММСК было изучено влияние сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг), выделенных из ткани плаценты на регенерацию миелоидной ткани костного мозга, красной и белой пульпы селезенки, эпителия тощей кишки в физиологических условиях, а также после воздействия экстремальных факторов. При этом влияние сочетанной аллогенной трансплантации на регенерацию тканей было изучено на лабораторных животных зрелого и старого возраста.

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 миелоидной ткани, красной и белой пульпе селезенки, в эпителии тощей кишки.

На 5 сутки в физиологических условиях после введения ММСК и ГСК в обеих возрастных группах выявлено увеличение пролиферативной активности в эритроидном ростке костного мозга. При этом у зрелых животных в миелоидной ткани установлено увеличение содержания эритробластов на 71,1 % ($p < 0,05$). У старых животных в миелоидной ткани отмечено увеличение содержания эритробластов и базофильных нормобластов на 69,2 % ($p < 0,05$) и 27,2 % ($p < 0,05$) соответственно. Содержание отдельных клеточных элементов и общее содержание клеток в гранулоцитарном ростке у старых и зрелых животных не отличалось от значений интактных животных. Следует отметить, что у старых животных, в отличие от животных зрелого возраста в костном мозге на 5 сутки обнаружено уменьшение содержания цитогенетически измененных клеток на 24,9 % ($p < 0,05$). Данный эффект можно объяснить способностью трансплантированных ММСК индуцировать выработку цитопротективных факторов — белков теплового шока (БТШ 70 кДа). Данные факторы способны поддерживать исходную конформацию белков, повышать устойчивость ферментов репарации, следствием чего будет снижение количества патологических митозов и, как результат, уменьшение содержания цитогенетически измененных клеток.

Изучая состояние быстрообновляющихся тканей зрелых животных на 5 сутки в физиологических условиях, также 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.

В физиологических условиях на 7 сутки после проведения аллогенной сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК у зрелых и старых лабораторных животных в костном мозге установлено повышение митотической активности в эритроидном диффероне на 30,9 % ($p < 0,05$) и 28,4 % ($p < 0,05$) соответственно. Указанные изменения в обеих возрастных группах привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов в костном мозге на 41,6 % ($p < 0,05$) и 25,8 % ($p < 0,05$). У лабораторных животных зрелого возраста активация эритропоэза достигалась за счет увеличения базофильных и полихроматофильных нормобластов соответственно на 27,5 % ($p < 0,05$) и 49,8 % ($p < 0,05$). У животных старого возраста активация эритропоэза была обеспечена увеличением содержания полихроматофильных нормобластов (+ 37,04 %, $p < 0,05$) (рис. 4).

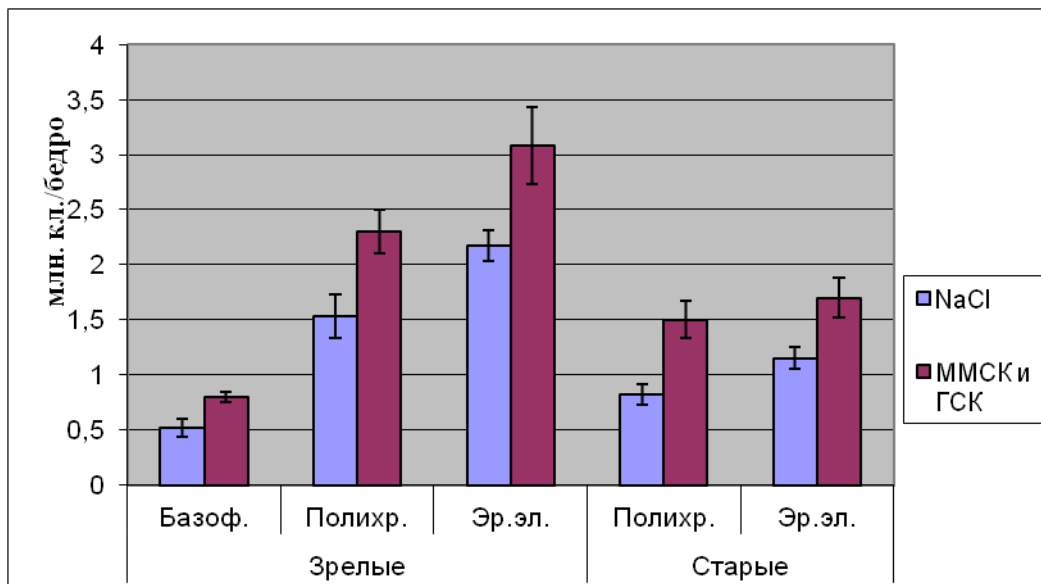


Рис. 4. Некоторые показатели миелограммы в физиологических условиях на 7 сутки после трансплантации стволовых клеток

В периферической крови у зрелых и старых животных отмечено повышение содержания ретикулоцитов. Активацию эритропоэза можно объяснить способностью ММСК обеспечивать хоуминг как собственных (аутологичных), 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.

На 7 сутки в физиологических условиях после трансплантации ММСК и ГСК показатель МЯТ у зрелых и старых животных сохранил ту же тенденцию, что имела место на 5 сутки. Так, было установлено, что после сочетанной трансплантации клеток изучаемый показатель у старых животных был на 30 % ($p < 0,05$) ниже, чем в контроле (рис. 5). В то же время данный показатель у зрелых животных не изменился и не отличался от контрольных значений.

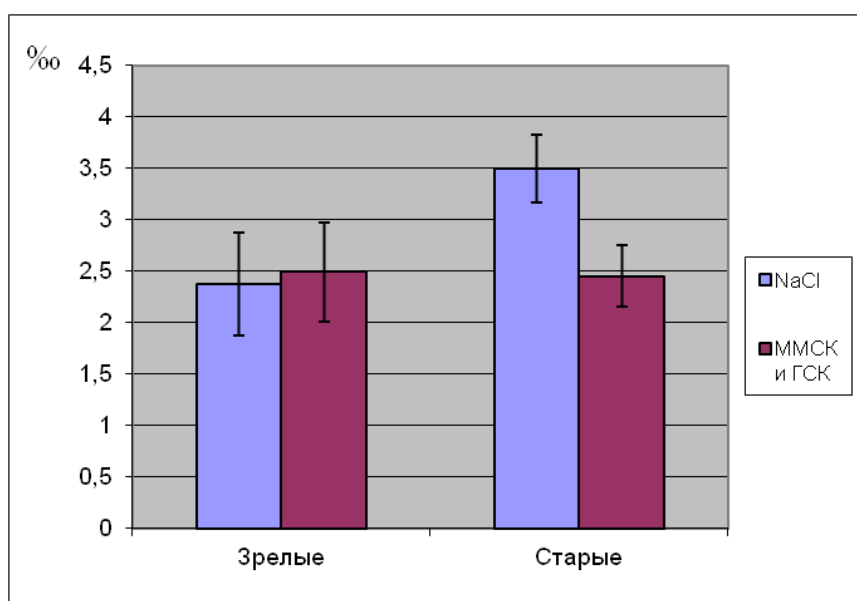


Рис. 5. Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в физиологических условиях на 7 сутки после трансплантации стволовых клеток

При изучении основных морфометрических показателей селезенки у зрелых и старых лабораторных животных установлено отсутствие их изменений. У зрелых и старых лабораторных животных произошло увеличение содержания клеток крипталльного 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. 6).

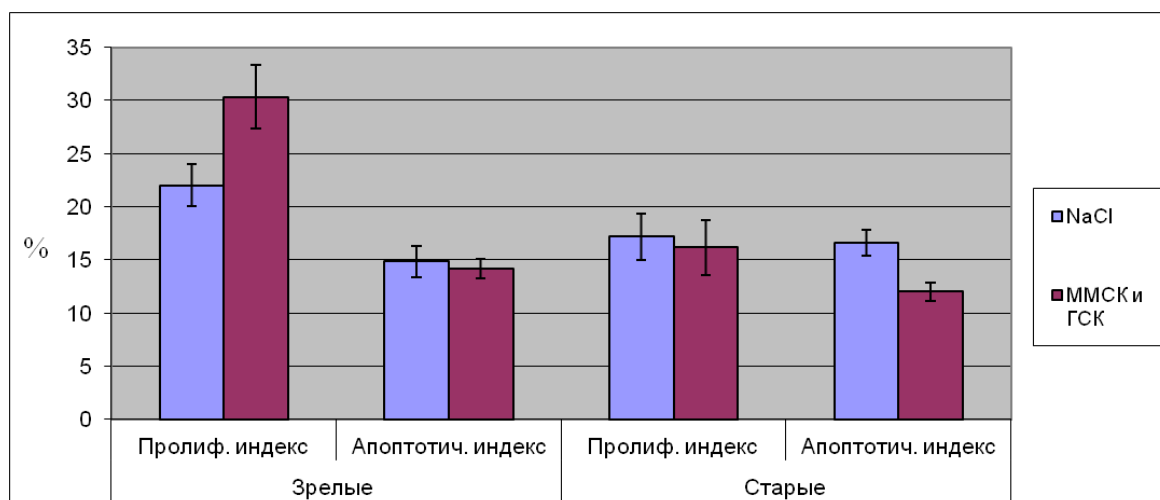


Рис. 6. Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки в физиологических условиях на 7 сутки после трансплантации стволовых клеток

На 1 сутки после воздействия ИИ у зрелых и старых животных на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в костном мозге при подсчете МЯТ установлено снижение содержания цитогенетически измененных клеток на 25,0 % ($p < 0,05$) и 23,8 % соответственно ($p < 0,05$) (рис. 7).

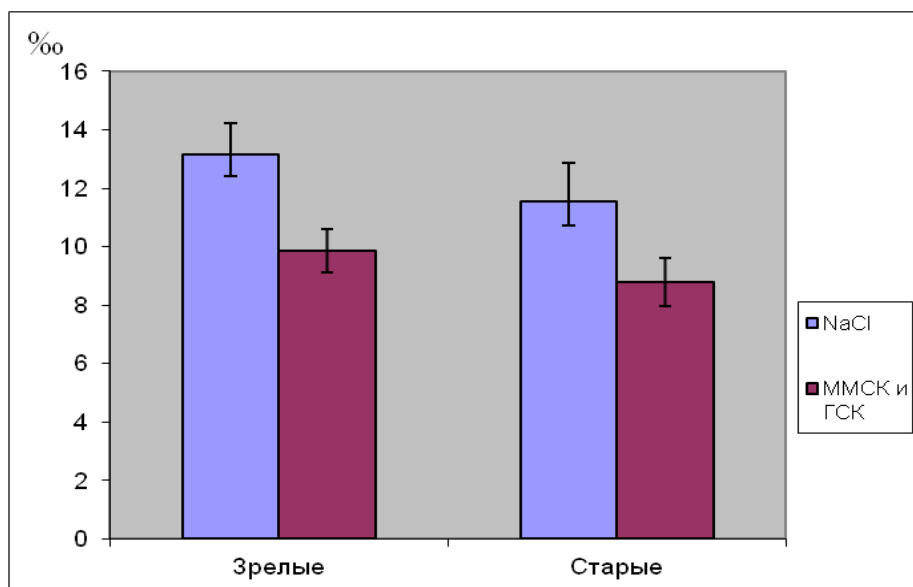


Рис. 7. Содержание полихроматофильных эритроцитов с микродрами у лабораторных животных на 1 сутки после воздействия ИИ

Показатели миелограммы и основные морфометрические показатели селезенки в этот период не отличались от данных контрольной подгруппы. 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, на 1 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации клеток существенных изменений в эпителии тощей кишки установлено не было (рис. 8).

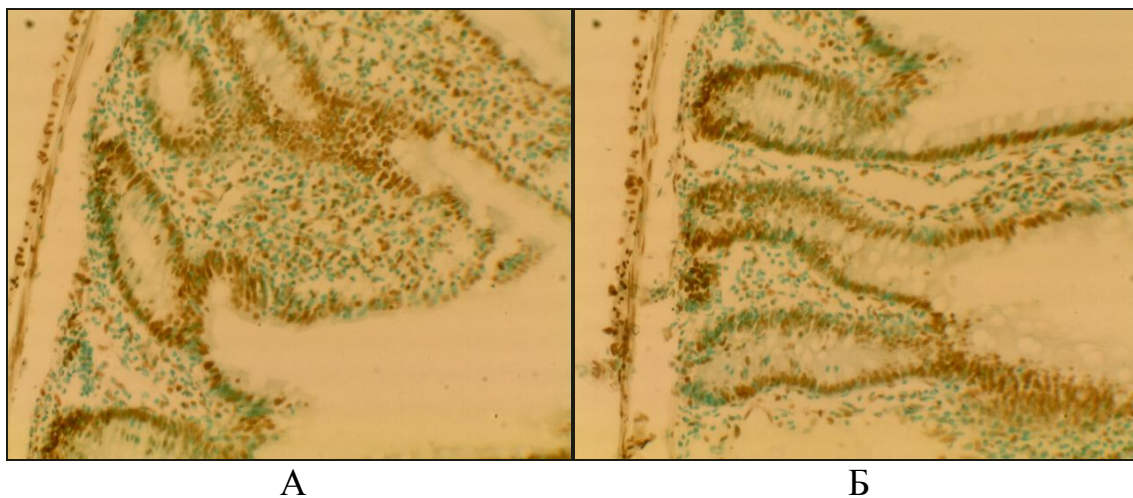


Рис. 8. Апоптоз эпителиоцитов тощей кишки на 1 сутки после воздействия ИИ. А — старых лабораторных животных; Б — зрелых лабораторных животных. Ув. x100

На 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК у зрелых и старых животных выявлена активация эритропоза и гранулоцитопоза. При этом установлено увеличение пролиферативной активности клеток данных ростков и увеличение общего количества эритроидных и гранулоцитарных элементов (рис. 9).

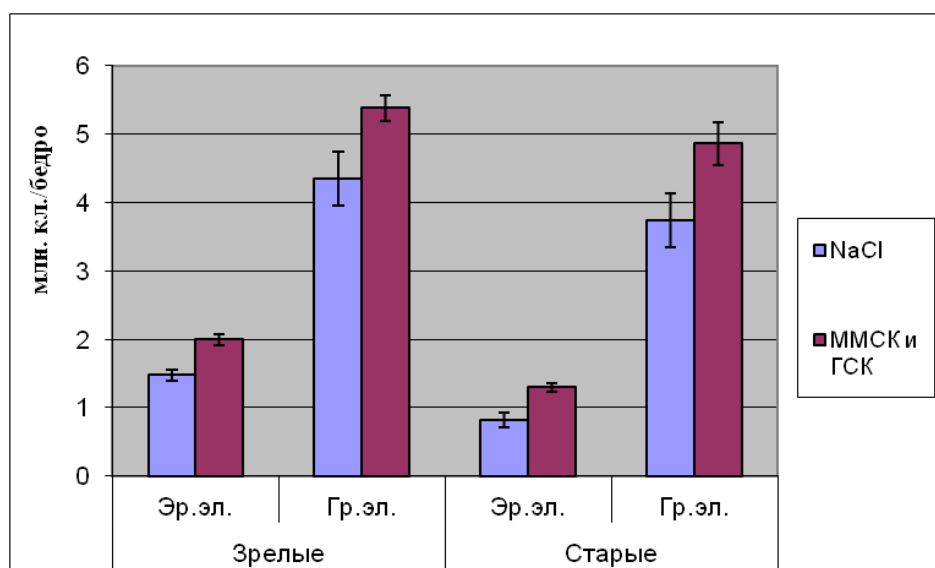


Рис. 9. Некоторые показатели миелограммы лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ

Активация эритропоэза у старых животных обусловлена увеличением количества эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов, у животных зрелого возраста — увеличением полихроматофильных нормобластов. При анализе данных периферической крови в обеих возрастных группах отмечалось увеличение количества ретикулоцитов. Активация гранулоцитопоэза у зрелых животных обусловлена увеличением количества миелобластов на 75,3 % ($p < 0,05$), миелоцитов — на 51,1 % ($p < 0,05$), палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов — на 21,7 % ($p < 0,05$). Повышенное количество гранулоцитарных лейкоцитов у старых лабораторных животных реализовано за счет увеличения содержания миелоцитов (+ 60,0 %, $p < 0,05$), метамиелоцитов (+ 19,5 %, $p < 0,05$), палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов (+ 29,8, $p < 0,05$). Указанные изменения привели к увеличению общей клеточности костного мозга у зрелых и старых животных соответственно на 26,1 % ($p < 0,05$) и 24,4 % ($p < 0,05$). Активацию гранулоцитопоэза можно объяснить способностью трансплантированных ММСК синтезировать ранее описанные факторы, которые обеспечивают направленный хоуминг трансплантированных и аутологичных ГСК в соответствующие ниши, а также выработкой ММСК физиологически активных веществ, способствующих лучшему приживлению ГСК. Синтез ММСК таких факторов как ГМ-КСФ, Г-ГСК, регулирует дифференцировку ГСК в гранулоцитарном направлении. Указанные свойства ММСК в совокупности с их иммуносупрессивными свойствами (синтез ПГ E_2 , TGF- β) обеспечивают активацию гранулоцитопоэза. В то же время при подсчете цитогенетически измененных клеток в костном мозге в обеих изучаемых возрастных группах обнаружено существенное снижение количества полихроматофильных эритроцитов с микроядрами. Это свидетельствует о снижении выраженности индуцированного мутагенеза в костном мозге.

На 7 сутки после воздействия ИИ в красной и белой пульпе селезенки в изучаемых возрастных группах установлен различный характер изменений после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК. У зрелых лабораторных

животных наблюдается восстановление площади лимфоидных фолликулов, площади герминативных центров, площади В-зоны лимфоидных фолликулов. Увеличение площади зоны роста фолликула свидетельствует, что увеличение площади фолликула обусловлено не только миграцией клеток крови в селезенку, но и активацией гемопоэза в самом органе.

Это подтверждается увеличением количества лимфобластов при оценке цитологической картины селезенки. Также было доказано восстановление содержания лимфоцитов, эритроидных клеток, гранулоцитов, макрофагов и моноцитов. Со стороны красной пульпы по сравнению с контрольной подгруппой отмечено увеличение плотности клеток за счет большего количества эритроидных клеток и гранулоцитов. Указанные изменения привели к увеличению клеточности селезенки. Следствием реакции красной пульпы на сочетанную трансплантацию стало увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов.

У старых животных в отличие от животных зрелого возраста не происходит выраженных изменений в состоянии белой пульпы на фоне трансплантации ММСК и ГСК. Общая площадь фолликула, площадь В-зоны и площадь Т-зоны фолликула остаются существенно меньше значений интактных животных и не отличаются от аналогичных параметров животных без трансплантации ММСК и ГСК. Более выражены изменения у старых животных в красной пульпе. Здесь, в отличие от зрелых, не обнаружено увеличения гранулоцитов и восстановления до значений нормы моноцитов и макрофагов, но также установлено увеличение количества эритроидных клеток. Это приводит к увеличению клеточности красной пульпы (рис. 10) и последующему увеличению расстояния между центрами лимфоидных фолликулов.

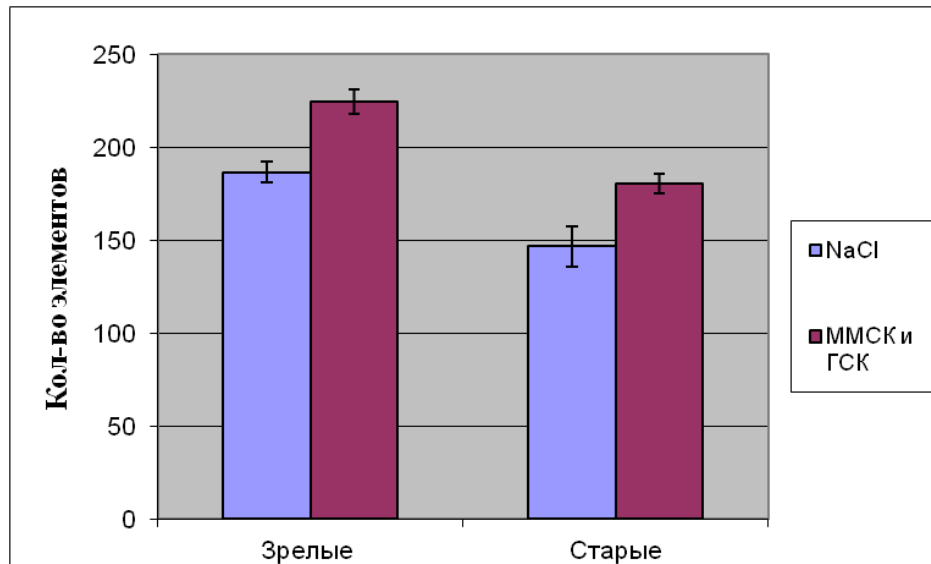


Рис. 10. Клеточность красной пульпы селезенки (в $0,01 \text{ мм}^2$) лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ

Учитывая, что в костном мозге мышей с возрастом уменьшается не только концентрация ГСК, но и их способность мигрировать в селезенку, полученные результаты свидетельствуют о способности ММСК усиливать восстановление морфометрических и цитологических показателей красной пульпы селезенки при сочетанном введении с ГСК в старом организме.

ММСК за счет выработки хемоаттрактанта обеспечивают направленный хоуминг не только трансплантированных ГСК в селезенку и последующую там активацию гранулоцитопоеза и эритропоеза, но и хоуминг аутологических ГСК.

При анализе регенерации эпителия тощей кишки у зрелых лабораторных животных отмечено увеличение количества эпителиоцитов крипт за счет увеличения пролиферативной активности клеток криптального 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 (рис. 11).

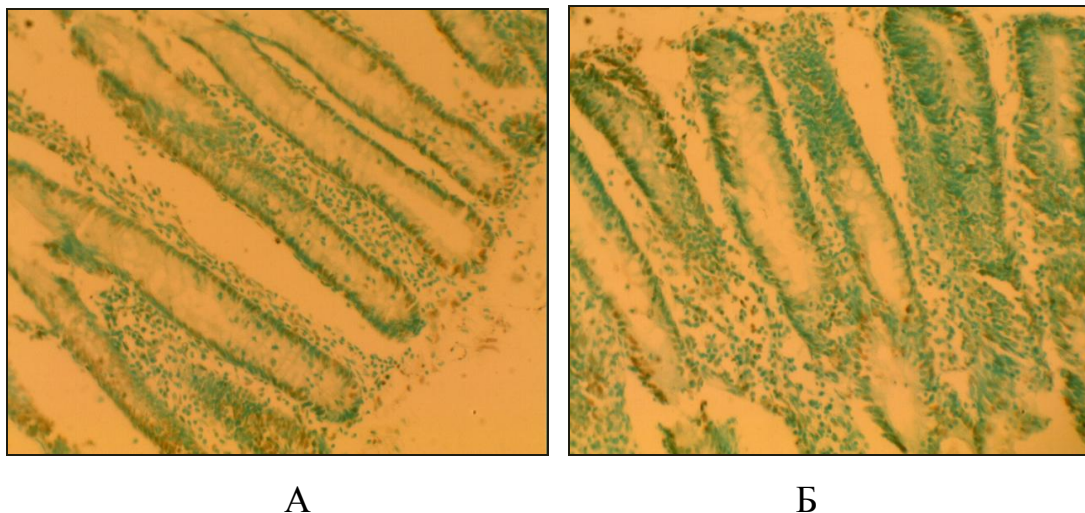


Рис. 11. Апоптоз эпителиоцитов тощей кишки на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн.клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг). А — старых лабораторных животных; Б — зрелых лабораторных животных. Ув. x 100

На 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК у зрелых животных содержание цитогенетически измененных клеток снизилось на 23,3 %, у старых — на 19,6% по сравнению с контролем (рис. 12).

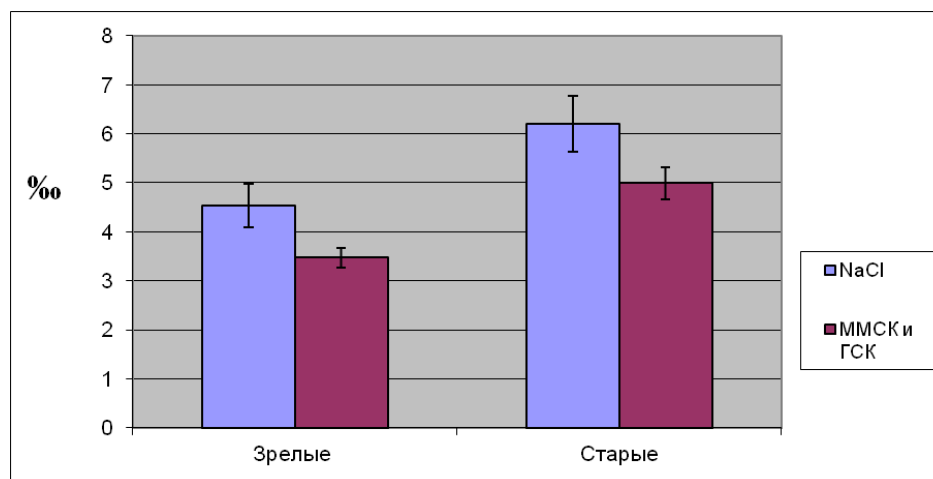


Рис. 12. Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери

В миелограмме зрелых и старых животных обнаружено стимулирующее действие проведенной сочетанной трансплантации клеток на гранулоцитопоз и эритропоз. В гранулоцитарном ростке зрелых и старых животных установлено увеличение содержания миелоцитов (+ 72,4 %, $p < 0,05$ и + 50,0 %, $p < 0,05$).

$p < 0,05$), метамиелоцитов (+ 31,4 %, $p < 0,05$ и + 34,4 %, $p < 0,05$), а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов (+ 28,5 %, $p < 0,05$ и + 24,4 %, $p < 0,05$). Указанные изменения привели к увеличению общего содержания гранулоцитов на 34,6 % и 25,7 % соответственно. В то же время в эритроидном ростке зрелых и старых животных обнаружено увеличение содержания полихроматофильных нормобластов на 48,1 % ($p < 0,05$) и 31,0 % ($p < 0,05$) соответственно. Следствием выявленных изменений было увеличение общего содержания эритроидных элементов в костном мозге на 34,6 % ($p < 0,05$) и 25,4 % ($p < 0,05$) соответственно (рис. 13).

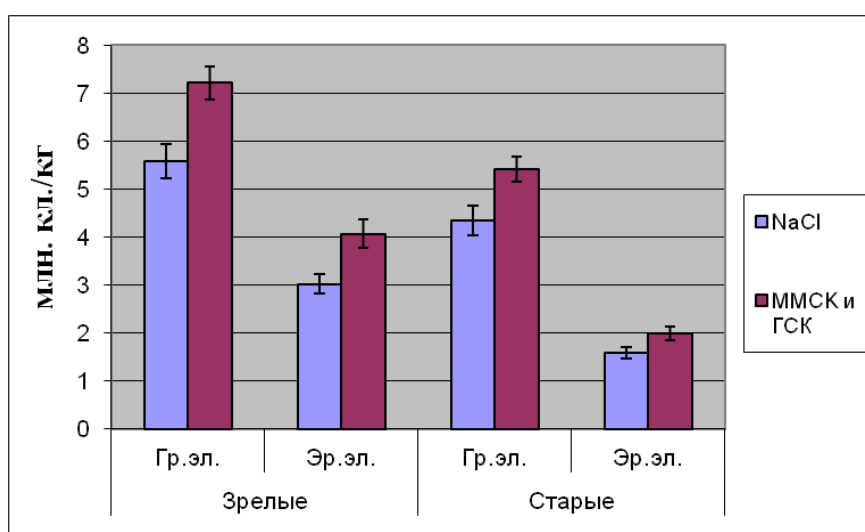


Рис. 13. Некоторые показатели миелограммы лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери

В периферической крови зрелых и старых лабораторных животных отмечено увеличение содержания ретикулоцитов и лейкоцитов.

На 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при анализе основных морфометрических показателей селезенки зрелых и старых животных выявлены некоторые отличия. В частности, у зрелых животных установлено уменьшение площади лимфоидных фолликулов на 25,7%, площади В-зоны лимфоидных фолликулов — на 19,9%, площади герминативного центра — на 32,9%. При изучении цитологической картины селезенки установлено снижение содержания лимфобластов, пролимфоцитов.

Уменьшение указанных показателей у зрелых животных можно объяснить иммуносупрессивными свойствами ММСК. В частности, способностью ММСК ингибировать хемотаксические свойства лимфоидных клеток, снижая экспрессию рецепторов CXCR4, CXCR5, участвующих в миграции В-лимфоцитов во вторичные лимфоидные органы, способностью вырабатывать повышенное количество NO-синтазы и TGF- β , которые вызывают торможение клеточного деления В-лимфоцитов. У старых лабораторных животных не отмечено значительного изменения морфометрических показателей белой пульпы. При анализе показателей красной пульпы у зрелых и старых животных доказано увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов (+ 22,3 % и + 18,9 %, $p < 0,05$), увеличение общей клеточности красной пульпы (+ 27,9 % и + 20,5 %, $p < 0,05$) (рис. 14).

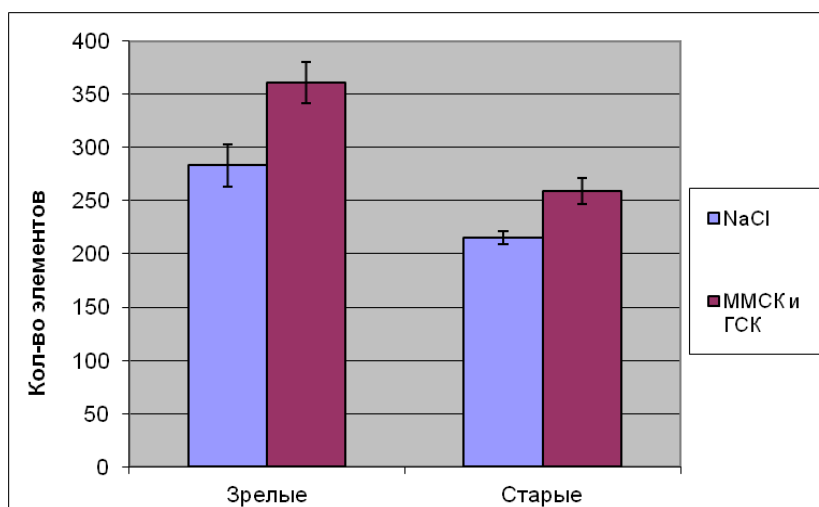


Рис. 14. Клеточность красной пульпы селезенки (в 0,01 мм²) лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери

По данным цитограммы селезенки у зрелых и старых лабораторных животных на фоне трансплантации ММСК и ГСК отмечено увеличение количества эритроидных клеток соответственно на 46,6 % ($p < 0,05$) и 32,2 % ($p < 0,05$).

С возрастом способность ГСК к миграции и дифференцировке значительно уменьшается. Трансплантируемые ММСК способны усиливать

миграцию ГСК в ткань селезенки за счет выработки хемоаттрактанта (SDF-1). Этот эффект реализуется как в отношении собственных КОЕс, так и трансплантированных ГСК, что определяет включение более выраженных компенсаторных механизмов в селезенке в ответ на острую кровопотерю.

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. 15).

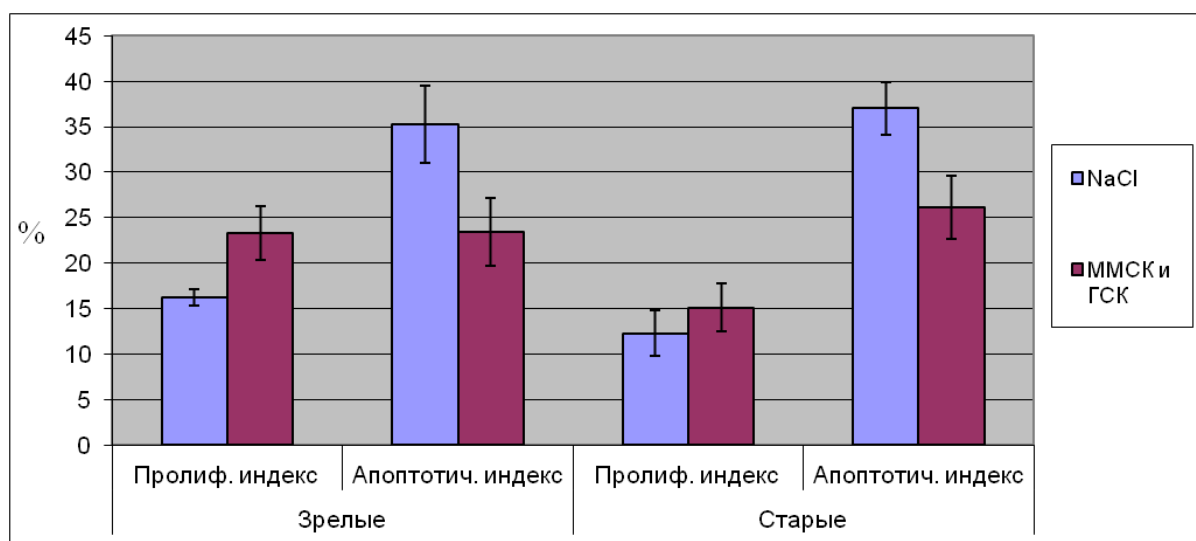


Рис. 15. Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери

Результаты собственных исследований позволили предложить схему, демонстрирующую возможность использования аллогенной сочетанной трансплантации ММСК и ГСК для активации регенерации быстрообновляющихся тканей в возрастном аспекте.

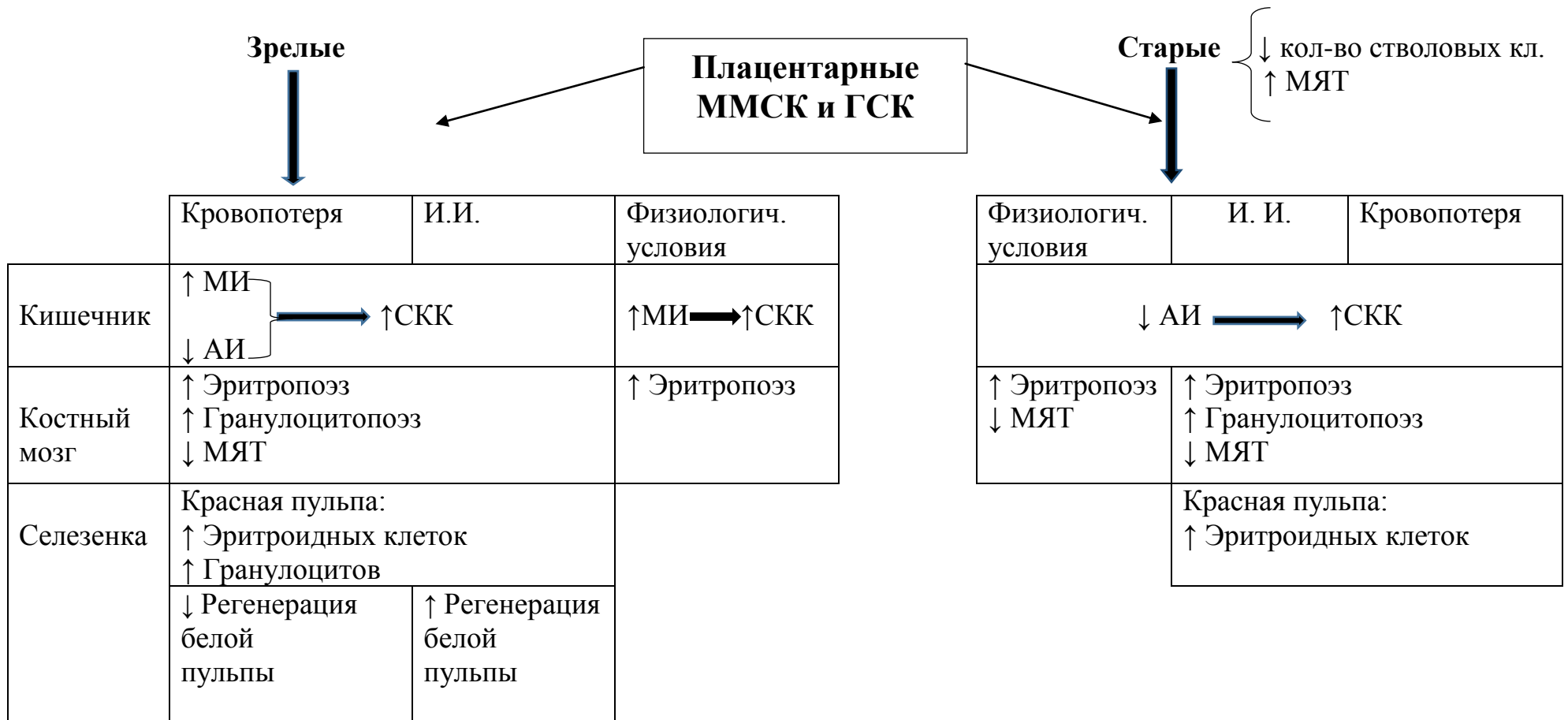


Рис. 16. Схема влияния сочетанной аллогенной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей

ВЫВОДЫ

1. Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК сопровождается активацией регенерации быстрообновляющихся тканей. При этом в условиях действия экстремальных факторов ответ на введение стволовых клеток более выраженный, чем в физиологических условиях.

2. В физиологических условиях и при воздействии экстремальных факторов минимальная эффективная доза ГСК при сочетанном введении с ММСК с целью активации регенерации быстрообновляющихся тканей составляет 330 тыс. клеток/кг.

3. Использование аллогенной сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях приводит к снижению содержания цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани у старых лабораторных животных. В то время как в условиях воздействия экстремальных факторов снижение содержания цитогенетически измененных клеток наблюдается и у зрелых лабораторных животных.

4. Сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях вызывает активацию эритропоэза у зрелых и старых животных, тогда как после воздействия экстремальных факторов в обеих возрастных группах происходит активация и эритропоэза, и гранулоцитопоэза.

5. 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.

6. Восстановление морфометрических и цитологических показателей селезенки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК зависит как от возраста, так и от характера повреждения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Маклакова, И. Ю. Характеристика и аспекты использования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, Е. В. Васильев // Вестник Уральской государственной медицинской академии. – 2008. – Вып. 16. – С. 36–39.

2. Маклакова, И. Ю. Оценка действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на миелоидную ткань старых лабораторных животных в условиях воздействия ионизирующего излучения / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, С. Е. Емельянова // Материалы IX международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке». – Москва, 2008. – Вып. 5. – С. 385–386.

3. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию миелоидной ткани в условиях воздействия ионизирующего излучения / А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, С. Е. Емельянова // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2008. - № 4. – С. 89–93.

4. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию миелоидной ткани старых животных в условиях воздействия ионизирующего излучения / А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, С. Е. Емельянова // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2008. - № 4. – С. 93–97.

5. Гребнев, Д. Ю. Возможности коррекции индуцированной мутагенной активности миелоидной ткани мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками / Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова, О. А. Бондаренко // Материалы межрегиональной научно–практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и наука: итоги и перспективы». – Саратов, 2008. – С. 67.

6. Маклакова, И. Ю. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на состояние миелоидной ткани в физиологических условиях и при воздействии ионизирующего излучения / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, С. Е. Емельянова // Материалы межрегиональной научно – практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и наука: итоги и перспективы». – Саратов, 2008. – С. 88–89.

7. Гребнев, Д. Ю. Коррекция возрастных изменений в миелоидной ткани старых лабораторных животных плацентарными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов». - Новосибирск, 2009. – С. 102–104.

8. Ястребов, А. П. Изменения мутагенной активности миелоидной ткани старых животных в условиях воздействия ионизирующего излучения под влиянием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты / А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10, № 1. – С. 111–112.

9. Ястребов, А. П. Изменения регенерации миелоидной ткани старых животных в условиях воздействия ионизирующего излучения под влиянием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты / А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10 № 1. – С. 112.

10. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на биохимические и гематологические показатели старых крыс / И. В. Гаврилов, Д. Ю. Гребнев, О. М. Бубеньщиков, В. Н. Мещанинов // Аллергология и иммунология. – 2009. - Том 10 № 1. – С. 111.

11. Маклакова, И. Ю. Комплексная оценка состояния эпителия тощей кишки зрелых лабораторных животных в условиях воздействия ионизирующего излучения на фоне введения мультипотентных

мезенхимальных стромальных клеток / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2009. - № 3. – С. 47.

12. Маклакова, И. Ю. Возможности коррекции пострadiационных повреждений эпителия тощей кишки у старых лабораторных животных с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2009. - № 3. – С. 46–47.

13. Маклакова, И. Ю. Оценка состояния миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных после острой кровопотери на фоне введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / И. Ю. Маклакова, А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2009. - № 2. – С. 102–103.

14. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию миелоидной ткани в условиях воздействия ионизирующего излучения / А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, С. Е. Емельянова // Вестник уральской государственной медицинской академии. – 2009. – № 18. – С. 40–45.

15. Использование стволовых клеток для восстановления тканей при старении / А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, В. А. Сырнев // Вестник уральской государственной медицинской академии. – 2009. – № 20. – С. 177–179.

16. Ястребов, А. П. К использованию трансплантации стволовых клеток для активации регенерации кроветворной ткани при воздействии ионизирующего излучения / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2010. - № 4 – С. 116–119.

17. Ястребов, А. П. Коррекция регенерации миелоидной ткани после острой кровопотери у старых экспериментальных животных / А. П. Ястребов,

Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2011. - № 4 – С. 103–105.

18. Гребнев, Д. Ю. Возможность коррекции морфометрических показателей селезенки с помощью стволовых клеток / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова // *Цитология* Т. 53, № 9. – 2011. – С. 730–731.

19. Изменение основных морфометрических показателей селезенки на фоне трансплантации стволовых клеток в условиях острой кровопотери / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, С. В. Сазонов, С. Л. Леонтьев, И. Ю. Маклакова // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2012. – Т. 7, №2. – С. 55.

20. Сравнительный анализ регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в условиях острой кровопотери на фоне трансплантации стволовых клеток / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, С. В. Сазонов, С. Л. Леонтьев. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2012. – Т.7, № 2. – С. 22–23.

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

22. Гребнев, Д. Ю. Активация регенерации эпителия тощей кишки с помощью стволовых клеток / Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2012. - № 3. – С. 68–69.

23. 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. – С. 141.

24. Ястребов, А. П. Анализ восстановления регенерации эпителия тощей кишки старых и зрелых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения на фоне введения стволовых клеток / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова // **Таврический медико-биологический вестник.** – 2012. – Т. 15, № 3. – С. 387–390.

25. Ястребов, А. П. Восстановление регенерации миелоидной ткани старых лабораторных животных после лучевого повреждения на фоне трансплантации стволовых клеток / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова // **Таврический медико-биологический вестник**. – 2012. – Т. 15. – № 3. – С. 391-394.

26. Гребнев, Д. Ю. Возможность восстановления регенерации тканей зрелых и старых лабораторных животных после острой кровопотери / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова // Третий съезд геронтологов и гериатров России: сб. тез. докл. – Новосибирск, 2012. – С. 82.

27. Ястребов, А. П. Активация регенерации кроветворной ткани с помощью стволовых клеток после острой кровопотери / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова // **Вестник уральской медицинской академической науки**. – 2012. – № 5. – С. 35–37.

28. Гребнев, Д. Ю. Перспективы применения стволовых клеток для коррекции морфометрических показателей селезенки после воздействия ионизирующего излучения / Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова, А. П. Ястребов // Материалы III съезда травматологов-ортопедов Уральского федерального округа Научно-практической конференции с международным участием «Чаклинские чтения». - Екатеринбург, 2012. – С. 39–40.

29. Гребнев, Д. Ю. Влияние сочетанной трансплантации стволовых клеток на основные морфометрические параметры селезенки старых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения / Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова, А. П. Ястребов // Проблемы старения и долголетия. – 2013. – Т. 22. – С. 22-23.

30. Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для активации гемопоэза старых лабораторных животных в условиях острой кровопотери / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, С. В. Сазонов, С. Л. Леонтьев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 7, № 3. – С. 17–18.

31. Исследование влияния стволовых клеток (ММСК, ГСК) на регенерацию селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова, С. В. Сазонов, С. Л. Леонтьев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 7, № 3. – С. 60.

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

33. Гребнев, Д. Ю. Перспектива использования стволовых клеток для активации кроветворения в условиях возрастной инволюции на фоне воздействия ионизирующего излучения / Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова, А. П. Ястребов // **Успехи Геронтологии**. – 2014. – Т. 27, № 2. – С. 348–352.

34. Гребнев, Д. Ю. Возможность использования сочетанной трансплантации стволовых клеток для активации гемопоэза у старых и зрелых лабораторных животных в условиях воздействия ионизирующего излучения / Д. Ю. Гребнев // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2014. – № 3. – С. 52–57.

Интеллектуальная собственность

1. Пат. 2312349 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/50. Способ оценки активности миелоидного дифферона / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, А. Е. Друй ; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию (ГОУ ВПО УГМА РОСЗДРАВА). - № 2006117483/15 ; заявл. 22.05.2006 ; опубл. 10.12.2007 // **Изобретения. Полезные модели**. – 2007. – Бюл. № 34 (III ч.). – С. 830.

2. Пат. 2391400 Российская Федерация, МПК C 12 N 5/0735, C 12 N 7/48. Способ снятия клеток с культуральной поверхности при проведении

пассажа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов ; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию (ГОУ ВПО УГМА РОСЗДРАВА). - № 2008141199/13 ; заявл. 16.10.2008 ; опубл. 10.06.2010 // Изобретения. Полезные модели. – 2010. Бюл. № 16 (III ч.). – С. 755.

3. 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.

4. Пат. 2415476 Российская Федерация, МПК G 09 B 23/28, А 61 К 35/50, А 61 Р 43/00. Способ восстановления эпителия тощей кишки 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»). - № 2009117024/14 ; заявл. 04.05.2009 ; опубл. 27.03.2011 // Изобретения. Полезные модели. – 2011. Бюл. № 9 (III ч.). – С. 778–779.

5. Пат. 80507 Российская Федерация, МКПО 19-07, 19-08. Схема влияния трансплантации ММСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и при воздействии экстремальных факторов / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова ; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГУЗ СОЦ ОСВМП «Институт медицинских клеточных технологий»). – № 2011500584 ; заявл. 02.03.2011 ; опубл. 16.12.2011 // Промышленные образцы. – 2011. – Бюл. № 12 (II ч.). – С. 349.

6. Пат. 2474610 Российская Федерация, МПК С 12 N 5/07, А 61 К 35/16. Способ выделения гемопоэтических стволовых клеток / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова, С. Л. Леонтьев, С. В. Сазонов ; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий). - № 2012109054/10 ; заявл. 11.03.2012 ; опубл. 10.02.2013 // Изобретения. Полезные модели. – 2013. – Бюл. № 4 (II ч.). – С. 248.

7. Пром. образец 87338 Российская Федерация, МКПО 19-07. Схема активации регенерации тканей с помощью стволовых клеток / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, С. В. Сазонов, И. Ю. Маклакова, С. Л. Леонтьев ; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий). - № 2012503883 ; заявл. 08.11.2012 ; опубл. 16.12.2013 // Промышленные образцы. – 2013. – Бюл. № 12 (II ч.). – С. 409.

8. Пром. образец 87339 Российская Федерация, МКПО 19-07. Схема влияния сочетанной трансплантации стволовых клеток на

быстрообновляющиеся ткани / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, С. В. Сазонов, И. Ю. Маклакова, С. Л. Леонтьев ; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий). - № 2012503884 ; заявл. 08.11.2012 ; опубл. 16.12.2013 // Промышленные образцы. – 2013. – Бюл. № 12 (II ч.). – С. 410–411.

9. Пат. 2481396 Российская Федерация, МПК С 12 N 5/00, G 01 N 33/49, А 61 К 35/12. Способ выделения гемопоэтических стволовых клеток методом иммуномагнитной сепарации / А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И. Ю. Маклакова ; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации» (ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития России). – № 2011137686/10 ; заявл. 13.09.2011 ; опубл. 10.05.2013 // Изобретения. Полезные модели. – 2013. – Бюл. № 13 (I ч.). – С. 239.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АИ	апоптотический индекс
БТШ	белки теплового шока
Г-КСФ	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ГМ-КСФ	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ГСК	гемопозитическая стволовая клетка
ИИ	ионизирующее излучение
ИП	индекс пролиферации
КОЕ-с	колониеобразующая единица селезенки
МИ	митотического индекс
ММСК	мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка
МЯТ	микроядерный тест
СКК	средняя клеточность крипты
CXCR4	хемокиновый рецептор - 4 тип
CXCR5	хемокиновый рецептор - 5 тип
SCA-1	антиген стволовой клетки-1
SCF	фактор стволовых клеток
SDF-1	стромой вырабатываемый фактор-1
TGF- β	трансформирующий фактор роста- β

Гребнев Дмитрий Юрьевич

Влияние стволовых клеток на процессы регенерации быстрообновляющихся
тканей при старении и после воздействия
экстремальных факторов

14.03.03 — Патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Автореферат напечатан по разрешению диссертационного совета Д 208.102.03
16.12.2014 г. ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России