

*На правах рукописи*

**Маклакова Ирина Юрьевна**

**ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ  
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ, НА  
РЕГЕНЕРАЦИЮ БЫСТРООБНОВЛЯЮЩИХСЯ ТКАНЕЙ ЗРЕЛЫХ И  
СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ  
ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ**

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Екатеринбург  
2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

**Научный руководитель**

Чл. – корр. РАМН, заслуженный деятель науки РФ,  
доктор медицинских наук, профессор **Ястребов Анатолий Петрович**

**Официальные оппоненты:**

академик РАМН, заслуженный деятель  
науки РФ, доктор медицинских наук,  
профессор

**Захаров Юрий Михайлович**

доктор медицинских наук, профессор

**Ларионов Леонид Петрович**

**Ведущая организация**

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тюменская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «22» апреля 2010 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета Д 208.102.03 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по адресу: 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО УГМА Росздрава, по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17, а с авторефератом на сайте академии [www.ru](http://www.ru)

Автореферат разослан «19» марта 2010 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор



**В.В. Базарный**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Последние десятилетия развития мировой медицинской науки характеризуются повышенным интересом к изучению биологии стволовых клеток и возможностью их использования в медицинской практике. Полученные результаты свидетельствуют о значительных возможностях для внедрения новых методов клеточной и тканевой терапии для лечения самых сложных болезней, при которых альтернативные лечебные мероприятия оказываются бессильными. Между тем, следует заметить, что многие вопросы, связанные с изучением механизмов действия стволовых клеток, возможностью их доставки в поврежденную ткань, направленной дифференцировки стволовых клеток остаются в значительной мере неизученными (Le Blanc K. et al., 2003; Majumdar M.K. et al., 2000; Sabatini F. et al., 2005). При старении организма развитие регенерации осуществляется на ином, отличном от молодого организма уровне, что может определять существенные различия в выраженности регенераторного ответа в ответ на действие экстремального фактора (Ястребов А.П., 2005, Хавинсон В.Х., 2007, Оловников А.М., 2009). В процессе старения развивается генерализованный G1/S – блок для процессов дифференцировки и пролиферации, нарушающий процессы клеточного самообновления (Кишкун А.А., 2008). Одной из возможностей преодолеть такой блок является увеличение в организме количества клеток, способных к дифференцировке и пролиферации. С этой целью можно использовать стволовые клетки. Можно полагать, что при использовании стволовых клеток для коррекции процессов старения в организме происходит повышение синтеза факторов роста, необходимых для поддержки дифференциации и пролиферации клеток, приводящее к восстановлению нарушенных при старении функций органов и систем (Захаров Ю.М., 2002; Бочков Н.П., 2002; Губин Г.Д., 1998). В настоящем исследовании изучалась возможность использования аллогенной трансплантации ММСК для воздействия на процессы регенерации в органах и системах при действии экстремальных факторов – ИИ, острой кровопотери, характер повреждений при которых во многом напоминает таковые, развивающиеся в результате старения организма (Квачева Ю.Е., 2002; Мазурик В.К., 1999). Основным источником получения стволовых клеток, является костный мозг, периферическая и пуповинная кровь (Волчков С.Е. с соавт., 2009; Калаумбаева М.З. с соавт., 2009; Jiang Y. et al., 2002). Между тем, фетальные органы по содержанию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток превосходят выше названные источники (Мелихова М.С. с соавт., 2007; Miki T. et al., 2007; Alviano F. et al., 2007; Zhang X. Et al., 2006). Однако получение таких клеток связано с определенными методическими трудностями. Также ограничивают использование стволовых клеток этические и некоторые другие проблемы. Можно также полагать, что мезенхимальные стволовые клетки плаценты имеют еще одно преимущество в сравнении с мезенхимальными стволовыми

клетками, полученными из других источников – они находятся в начальном периоде своей жизни и могут обладать в этой связи пролонгированным терапевтическим эффектом, что особенно существенно при их использовании в гериатрической практике.

**Цель исследования.** Изучить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на регенерацию тканей зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и при воздействии экстремальных факторов (кровопотеря, ионизирующее излучение).

**Задачи исследования:**

1. Оценить состояние пролиферативной активности быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях.

2. Изучить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях.

3. Изучить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных в условиях воздействия экстремальных факторов – ионизирующего излучения и острой кровопотери.

4. Изучить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты на состояние эпителия кишечника зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и после воздействия экстремальных факторов.

5. Дать сравнительную оценку воздействия трансплантированных ММСК на активность регенерации быстрообновляющихся тканей у зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях экстремального повреждения.

**Научная новизна.** На основании проведенного исследования доказана возможность использования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, для обеспечения эффективной регенерации тканей в физиологических условиях и в условиях воздействия на организм экстремальных факторов. Показано, что трансплантация ММСК в физиологических условиях оказывает стимулирующее действие на эритропоэз зрелых и старых лабораторных животных, вызывает увеличение содержания криптального эпителия тощей кишки. У старых животных при этом происходит снижение уровня цитогенетически измененных клеток. В условиях воздействия ионизирующего излучения трансплантация ММСК также приводит к существенному увеличению средней клеточности крипты. У зрелых лабораторных животных данный механизм реализуется за счет повышения митотической активности эпителиоцитов и угнетения апоптоза, у старых – за счет ингибирования запрограммированной клеточной гибели.

Установлено, что в условиях воздействия экстремальных факторов (ионизирующего излучения, острой кровопотери) введение ММСК зрелым и старым лабораторным животным приводит к стимуляции эритропоэза, снижению мутагенной активности, стимуляции гранулоцитопоеза у зрелых животных.

На основании проведенных исследований можно заключить, что старые лабораторные животные сохраняют способность при воздействии ММСК к активации регенерации быстрообновляющихся тканей, как в физиологических условиях, так и после воздействия экстремальных факторов.

Полученные результаты исследования послужили основой для получения двух положительных решений о выдаче патента на изобретение:

1.) от 14.01.2010: «Способ восстановления регенерации миелоидной ткани после воздействия ионизирующего излучения, путем аллогенной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты»;

2.) от 25.02.2010: «Способ снятия клеток с культуральной поверхности при проведении пассажа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Выполненная работа явилась доказательством возможности использования трансплантации ММСК для повышения активности регенерации быстрообновляющихся тканей в условиях воздействия экстремальных факторов. При этом, активация регенерации после введения ММСК зарегистрирована как у зрелых, так и у старых лабораторных животных.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Трансплантация ММСК зрелым лабораторным животным в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов (ионизирующее излучение, острая кровопотеря) оказывает стимулирующее действие на пролиферативную активность быстрообновляющихся тканей (эпителий тощей кишки, миелоидная ткань).

2. У старых лабораторных животных сохраняется способность к активации регенерации быстрообновляющихся тканей при трансплантации ММСК, как в физиологических условиях, так и в условиях воздействия экстремальных факторов.

**Практическое внедрение результатов исследования**

Результаты исследований внедрены в учебный процесс на кафедрах патологической физиологии и биохимии в разделы: экстремальные воздействия, геронтология.

Разработанная методика по выделению и культивированию ММСК внедрена в работу лаборатории геронтологии ГУЗ СО института медицинских клеточных технологий.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на:

63-й и 64-й Всероссийских научно-практических конференциях молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» на секции «Медико-биологические дисциплины» среди молодых ученых г. Екатеринбург, 2008, 2009 гг.

IV съезд физиологов Урала (с международным участием). г. Екатеринбург, 2009 г.

Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов» г. Новосибирск, 2009 г.

### **Публикации**

Основное содержание работы отражено в 14 научных статьях, из них 7 в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, главы литературного обзора, глав собственных исследований, выводов и списка литературы, включающего 223 источника (103 отечественных, 115 иностранных).

Диссертация содержит 181 страницу машинописного текста. Работа иллюстрирована 62 таблицами и 36 рисунками.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Общая характеристика лабораторных животных, использованных в исследованиях, дозы и способы введения.

Эксперименты выполнены на 56 белых лабораторных крысах-самцах возраста 6-8 месяцев, массой 200-220 г и 56 крысах-самцах возраста 3 года, массой 300 г. Эксперименты по получению культуры ММСК выполнены на 24 лабораторных животных крысах-самках возраста 3-4 месяца, массой 150-170 г, срок гестации 18 дней. Эксперименты по постановке методики выделения и культивирования ММСК, оценке их жизнеспособности выполнены на 56 крысах-самках возраста 3-4 месяца. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария при естественном освещении и сбалансированном рационе.

Выделение культуры ММСК осуществлялось согласно модифицированному методу А.С. Тепляшина с соавторами (1996 г.). Культивирование проводилось в условиях CO<sub>2</sub> инкубатора при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием углекислого газа 5 %. Смену питательной среды производили каждые 3-4 суток. Подсчет клеток производили в гемоцитометре (камере Горяева). Расчет количества клеток в 1 мл суспензии производили по формуле:  $X = a \cdot 10000$ , где X – число клеток в 1 мл суспензии; a – сумма клеток в малых квадратах. Жизнеспособность

выделенных клеток определялась с использованием различных красителей - трипанового синего, а также флуоресцентной метки акридин оранжевый. Жизнеспособность полученной культуры составляла 95 -97 %. Субкультивирование клеток (пересев) осуществляли по достижении ими 70 -80 % монослоя.

Для подтверждения принадлежности культуры к ММСК производилась дифференцировка полученной культуры в адипоцитарном и остеогенном направлениях, а также окраска культуры с помощью набора первичных и вторичных антител Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Rat) (Millipore), содержащего позитивные и негативные маркеры.

Изучение влияния ММСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных в условиях воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери.

Использовалось воздействие ионизирующего излучения в дозе 3 Гр (мощность поглощенной дозы 15 сГр/мин) и острая кровопотеря. Тотальное облучение крыс осуществлялось однократно  $\gamma$ -излучением. В качестве источника  $\gamma$ -квантов был использован  $^{60}\text{Co}$ . Контрольную группу составили животные, не подвергшиеся облучению. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения

Массивную кровопотерю вызывали кровопусканием из хвостовой вены крысы в объеме 2 % от массы тела, что составляет 25 – 35 % от объема циркулирующей крови. Забой животных осуществлялся на 5 сутки после острой кровопотери.

В зависимости от возраста животные были разделены на 2 группы (старые и зрелые). Внутри каждой группы было выделено 2 подгруппы (опытная и контрольная) по 7 животных в каждой. Животным опытной подгруппы внутривенно вводилась суспензия ММСК 6 млн клеток/кг.; вторая подгруппа крыс являлась контролем, животным вводили физиологический раствор – 0,5 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после моделирования экстремального воздействия однократно в указанных выше дозах.

Морфологическое исследование крови и костного мозга.

Кровь для исследования брали у крыс из хвостовой вены.

Подсчет количества лейкоцитов проводили в счетной камере Горяева (Меньшиков В.В. и соавторы 1994 г.).

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.

Для исследования морфологии костного мозга его извлекали из бедренной кости. Мазки костного мозга окрашивали по Нохту (Меньшиков В.В. и соавторы 1994 г.). Подсчет миелограммы производили на 1000 клеток.

Определяли общее количество миелокариоцитов в костном мозге бедренной кости (Груздев Г. П., 1965).

Были изготовлены цитологические препараты костного мозга, окрашенные по Паппенгейму (для выявления микроядер в полихроматофильных нормобластах).

Митотический индекс клеток эритроидного и гранулоцитарного дифференцировочного гемопоэза рассчитывался как отношение числа митотически делящихся элементов изучаемого ростка к общему числу подсчитанных клеток. (Меньшиков В.В. и соавторы 1994 г.).

МЯТ рассчитывали как отношение числа полихроматофилов с микроядрами к 1000 подсчитанных полихроматофилов, выраженное в промидах (Методические рекомендации по оценке мутагенной активности химических веществ микроядерным тестом подготовлены Всесоюзным научно – исследовательским институтом дезинфекции и стерилизации Министерства здравоохранения СССР, Москва 1984).

Цитологические препараты костного мозга и периферической крови анализировали с помощью микроскопа Micros MC – 50 при увеличении 100\*15.

Методы оценки регенераторных процессов в слизистой оболочке тощей кишки.

Были изготовлены гистологические препараты тощей кишки, срезы толщиной 5 мкм с соблюдением строгой ориентации ворсин и крипт, окрашенные гематоксилин – эозином (для определения митотического, апоптотического индексов и средней клеточности крипты).

Подсчет числа митотически делящихся клеток с учетом количества анализируемых крипт и количества клеток в них при общем числе просчитанных клеток от 3000 до 3500 позволил рассчитать митотический индекс, как отношение числа митотически делящихся клеток к общему числу просчитанных энтероцитов, выраженное в процентах. Среднюю клеточность в одной крипте определяли как отношение числа криптальных клеток к количеству анализированных крипт (Труфакин В.А. и др., 1990).

Апоптотический индекс определялся отношением клеток в состоянии апоптоза к общему числу просчитанных энтероцитов, выраженное в процентах.

Гистологические препараты тощей кишки анализировали с помощью микроскопа Micros MC – 50 при увеличении 100\*15.

Для выявления клеток, находящихся на различных стадиях программированной клеточной гибели и подсчета апоптотического индекса (АИ) производилась окраска срезов тощей кишки красителями акридиновым оранжевым и Annexin V, меченным флуоресцеинизотиоцианатом (FITC).

Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Micromed – 2 вариант 12 (увеличение 40\*10) при длине волны световой абсорбции 495 нм.

#### **Методы статистической обработки полученных результатов.**

Сравнение изучаемых показателей лабораторных животных, которым вводились препараты, проводилось с контролем и контрольной подгруппой. В качестве контроля были выбраны лабораторные животные, не

подвергшиеся воздействию экстремального фактора и которым вводился физиологический раствор. Контрольной подгруппе соответствовали подопытные животные, подвергшиеся воздействию того экстремального фактора, что и анализируемая опытная подгруппа. Животным контрольной подгруппы вводился физиологический раствор.

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий между подгруппами оценивали с помощью  $t$  – критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Также использовались параметрические методы анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования позволили установить влияние трансплантации ММСК на процессы регенерации миелоидной ткани и эпителия кишечника у зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов.

Анализируя показатели миелограммы зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, отмечено сниженное содержание клеток пролиферативного пула гранулоцитарного дифферона – промиелоцитов и повышенное содержание клеток созревающего пула – метамиелоцитов у старых животных по сравнению со зрелыми. При анализе эритроидного дифферона также отмечено сниженное содержание клеток пролиферативного пула - базофильных нормобластов у старых животных по сравнению со зрелыми лабораторными животными.

Также можно заметить, что у зрелых и старых лабораторных животных меняется соотношение пролиферирующих и созревающих клеток. У старых животных преобладают созревающие клетки миелоидной ткани, тогда как у зрелых – пролиферирующие. Это можно объяснить увеличением продолжительности митотического цикла старых лабораторных животных по сравнению со зрелыми животными (Сазонов С.В. 1999 г.).

Изменения в структуре пролиферативного пула миелоидных клеток старых лабораторных животных могут быть связаны с состоянием митотической активности клеток этой ткани. Так митотический индекс эритроидного дифферона у старых животных на 49 % ниже, чем у зрелых, а гранулоцитарного дифферона на 39 % ниже аналогичного показателя зрелых животных.

При анализе показателей мутагенной активности гемопоэтических клеток костного мозга, отмечен более высокий уровень цитогенетически измененных клеток (в 2,7 раза) у старых лабораторных животных по сравнению со зрелыми животными. Это может быть следствием увеличения с возрастом количества патологических митозов.

В периферической крови отмечено снижение общего содержания гранулоцитов и ретикулоцитов у старых лабораторных животных относительно зрелых.

Таким образом, в физиологических условиях у старых лабораторных животных отмечено снижение пролиферативной активности клеток костного мозга и повышение уровня цитогенетически измененных клеток по сравнению со зрелыми животными.

Митотический индекс эпителиоцитов тощей кишки старых лабораторных животных на 37,7 % ниже показателя зрелых, а средняя клеточность одной крипты старых лабораторных животных на 26,6 % ниже относительно зрелых, что свидетельствует о снижении пролиферативной активности эпителия тощей кишки у старых животных (рисунок 1, 2).

Рисунок 1

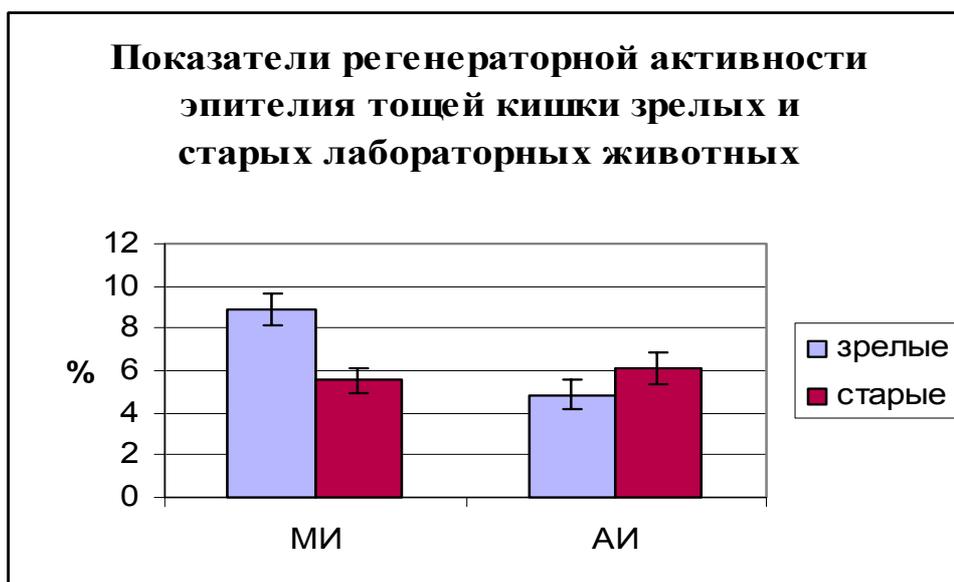
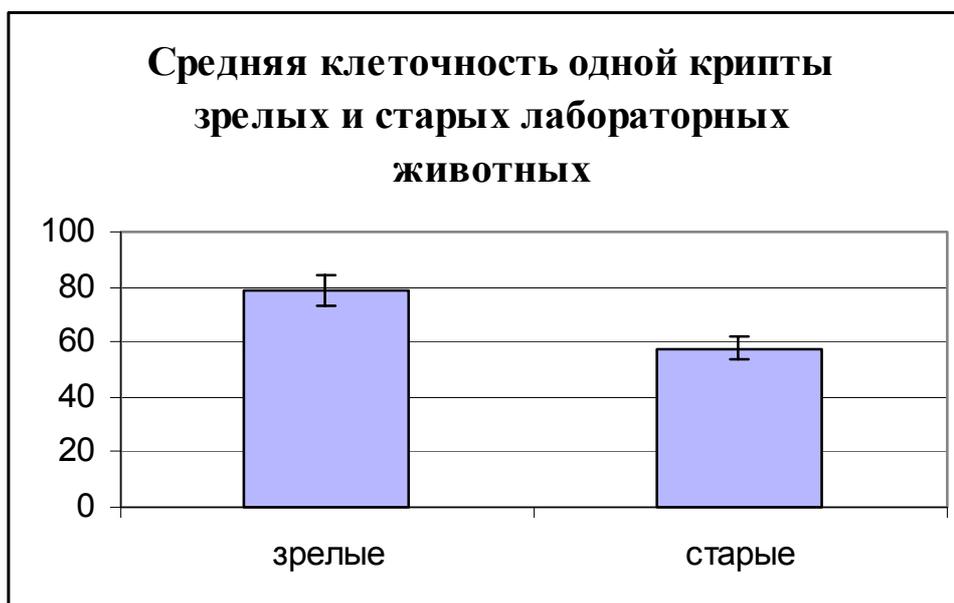


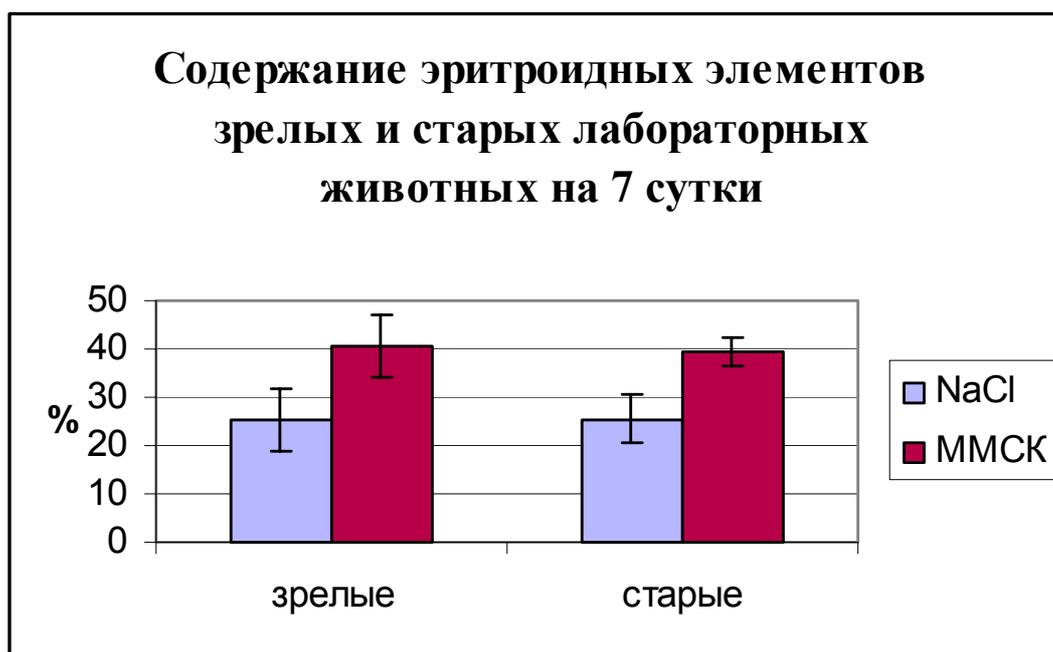
Рисунок 2



Трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным в физиологических условиях оказывает стимулирующее действие на процессы регенерации миелоидной ткани и эпителия тощей кишки.

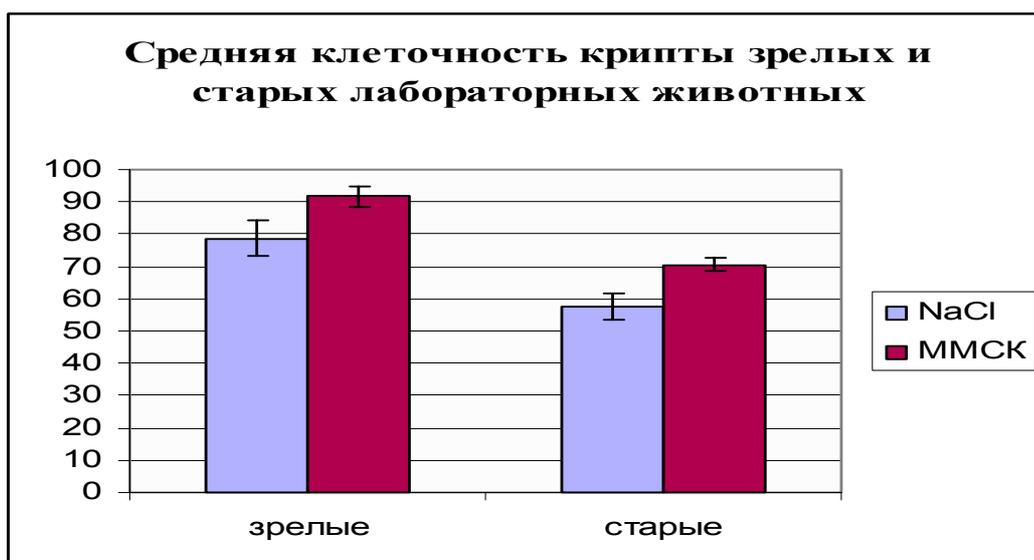
Так, на 7 сутки после введения ММСК у зрелых лабораторных животных выявлено повышение содержания эритроидных элементов на 37 %, у старых – на 35,6 % (рисунок 3). И у зрелых, и у старых лабораторных животных отмечено снижение гранулоцитарно-эритробластического соотношения, что говорит о преимущественной стимуляции в физиологических условиях эритроидного роста при трансплантации ММСК.

Рисунок 3



В периферической крови на 7 сутки после введения ММСК в физиологических условиях отмечено увеличение числа ретикулоцитов как у зрелых (на 35,5 %), так и у старых лабораторных животных (на 27 %). У старых лабораторных животных отмечено снижение уровня цитогенетически измененных клеток на 41 %, что можно объяснить снижением в этих условиях уровня патологических митозов.

При введении ММСК повысилась средняя клеточность одной крипты у зрелых и старых лабораторных животных (зрелые:  $91,60 \pm 3,03$ ,  $p < 0,05$ ; старые:  $70,52 \pm 2,18$ ,  $p < 0,05$ ) (рисунок 4).



На 7 сутки после воздействия ИИ в контрольной подгруппе зрелых и старых лабораторных животных в миелоидной ткани сохранялось снижение всех изучаемых показателей в клетках эритроидного и гранулоцитарного дифферонов. При этом у зрелых лабораторных животных содержание лимфоцитов достигло значений нормы, тогда как у старых животных восстановления содержания лимфоцитов не произошло ( $3,88 \pm 0,92$ ,  $p < 0,05$ ).

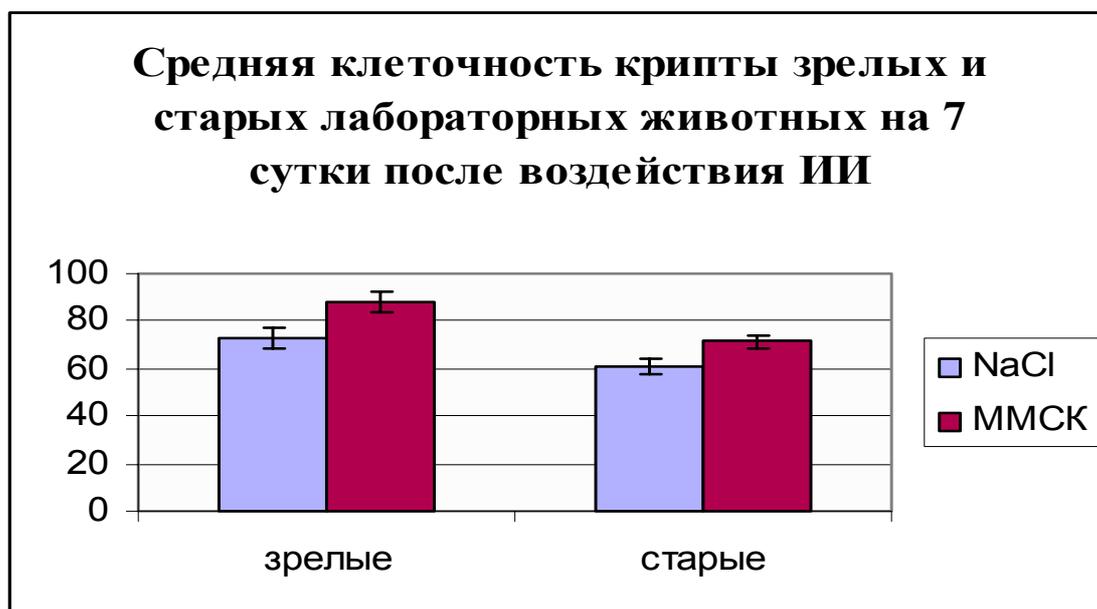
Установлено также, что содержание цитогенетически измененных клеток в исследуемый период было выше значений СУМ (на 64,4 % выше СУМ у зрелых и на 37,8 % у старых животных).

Количество митотически делящихся эпителиоцитов тощей кишки и средняя клеточность крипты на 7 сутки после воздействия ИИ достигли исходной величины, в то время как содержание клеток в состоянии апоптоза оставалось существенно выше значений нормы (на 36,2 % у зрелых животных и на 19,2 % у старых).

Трансплантация ММСК к 7 суткам после воздействия ИИ оказывала стимулирующее действие на эритропоэз, на гранулоцитопоэз и пролиферативную активность кишечника зрелых и старых лабораторных животных относительно соответствующих показателей контрольных подгрупп. Так, у зрелых лабораторных животных отмечено повышение содержания эритроидных и гранулоцитарных элементов (эр.эл.  $14,67 \pm 2,79$ ,  $p < 0,05$ ; гр.эл.  $48,42 \pm 2,38$ ,  $p < 0,05$ ), у старых животных увеличилось содержание всех эритроидных элементов ( $24,23 \pm 1,58$ ,  $p < 0,05$ ) (рисунок 5). Отмечено существенное увеличение средней клеточности одной крипты у зрелых и старых лабораторных животных (зрелые:  $88,15 \pm 4,42$ ,  $p < 0,05$ , старые:  $71,42 \pm 2,70$ ,  $p < 0,05$ ) (рисунок 6). У зрелых лабораторных животных это произошло за счет повышения митотической активности эпителиоцитов на 26,2 % и угнетения апоптоза на 28 % относительно контрольной подгруппы, у старых – за счет ингибирования запрограммированной клеточной гибели.



Рисунок 6.



Цитопротективное действие MMCK также выявлено в изменении показателей миелоидной ткани – уровень цитогенетически измененных клеток на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне введения MMCK был снижен на 47,8 % у зрелых и на 19,7 % у старых лабораторных животных.

Выявленный в данном исследовании цитопротективный эффект можно объяснить способностью MMCK синтезировать различные колониестимулирующие факторы (ГМ-КСФ, Г-КСФ). Возможно, это не единственный механизм участия MMCK в восстановлении гемопоэза. MMCK

также синтезируют многочисленные ангиогенные факторы (ангиопоэтин 1, platelet-derived growth factor), могут вырабатывать цитокин HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 alpha), который оказывает цитопротективное действие и ингибирует апоптоз (Шахова В.П. с соавт.; 2008; Матюкова А.А. с соавт.; 2007)

Можно также полагать, что в условиях экстремального повреждения ММСК значительно увеличивают продукцию белков теплового шока (БТШ) (HSP 70), уровень которых при этом многократно увеличивается.

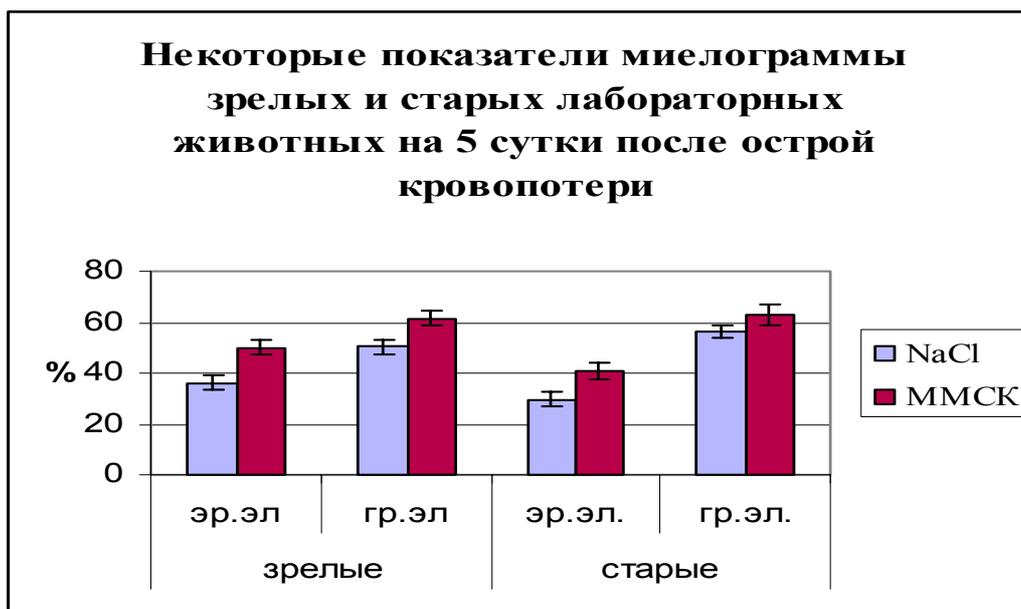
Состояние регенерации кроветворной ткани зрелых и старых лабораторных животных исследовалось также в условиях острой кровопотери и трансплантации ММСК.

Острую кровопотерю вызывали кровопусканием из хвостовой вены крысы в объеме 2 % от массы тела, что составляет 25 – 35 % от общего объема циркулирующей крови. Производилась оценка показателей миелограммы, периферической крови, мутагенной активности гемопоэтических клеток костного мозга на 5 сутки после острой кровопотери и введения ММСК.

На 5 сутки после острой кровопотери отмечена активация эритропоэза у зрелых и, в меньшей степени, у старых лабораторных животных. Так, увеличилось общее содержание эритроидных элементов костного мозга у зрелых животных на 30,4 %. Кроме того, на 5 сутки после острой кровопотери выявлено увеличение митотического индекса эритроидного дифферона на 40,5 % у зрелых и на 48,7 % у старых лабораторных животных, повысилось содержание цитогенетически измененных клеток у зрелых лабораторных животных на 57,8 %.

На фоне проведенной трансплантации ММСК на 5 сутки после острой кровопотери отмечается выраженный регенераторный ответ со стороны эритропоэза. Так, при подсчете миелограммы зрелых и старых лабораторных животных выявлено повышение активности эритроидного дифферона по сравнению с контрольными подгруппами. Отмечено увеличение общего содержания эритроидных элементов на 27,6 % у зрелых и на 27,4 % у старых лабораторных животных. Показатель ГЭС был существенно ниже аналогичного показателя в контрольной группе, что свидетельствует о преобладающей стимуляции эритропоэза над стимуляцией гранулоцитопоэза у зрелых и старых лабораторных животных после острой кровопотери на фоне трансплантации ММСК.

В гранулоцитарном ростке костного мозга зрелых лабораторных животных, отмечено повышение содержания миелобластов ( $1,93 \pm 0,27$  %,  $p < 0,05$ ), промиелоцитов ( $2,57 \pm 0,33$  %,  $p < 0,05$ ) и миелоцитов ( $11,08 \pm 0,33$  %,  $p < 0,05$ ) относительно контрольной группы. Установлено также повышение митотической активности элементов гранулоцитарного ростка (МИ гр.эл.:  $4,00 \pm 0,33$  ‰,  $p < 0,05$ ). Эти изменения сопровождались увеличением общего содержания гранулоцитарных элементов в миелоидной ткани зрелых животных, в то время, как у старых лабораторных животных активность гранулоцитарного дифферона существенно не изменяется (рисунок 7).



После введения ММСК как у зрелых, так и у старых лабораторных животных уровень цитогенетически измененных клеток снижался.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о более низком уровне пролиферативной активности клеток миелоидной ткани и регенераторной активности эпителия тощей кишки в физиологических условиях и в условиях экстремального повреждения у старых лабораторных животных.

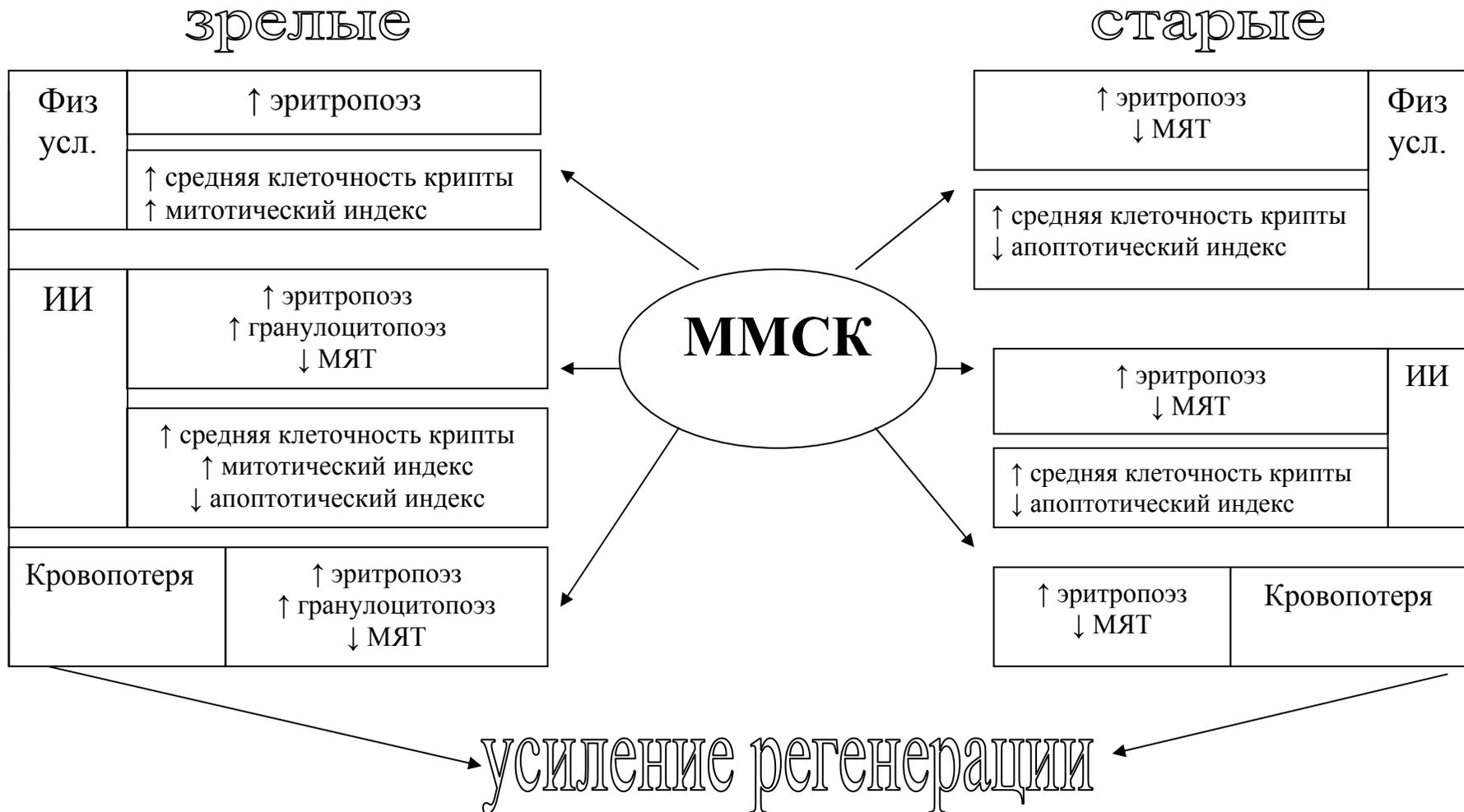
Установлено также, что внутривенная трансплантация суспензии ММСК в физиологических условиях у зрелых и старых лабораторных животных приводит к стимуляции эритропоэза, увеличению скорости клеточного обновления криптального эпителия тощей кишки. Обнаружена способность ММСК снижать мутагенную активность миелоидной ткани старых лабораторных животных в физиологических условиях и ингибировать апоптоз.

В условиях экстремального повреждения трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным оказывает активирующее влияние на эритропоэз, гранулоцитопоэз, регенераторную активность эпителиоцитов тощей кишки, снижает индуцированный мутагенез, оказывает антиапоптогенное действие на эпителиоциты кишечника.

Результаты полученных экспериментальных исследований позволяют заключить, что старые лабораторные животные сохраняют способность при воздействии ММСК к усилению регенерации в быстрообновляющихся тканях, как в физиологических, так и в условиях воздействия экстремальных факторов.

Результаты собственных исследований и анализ литературных данных позволил предложить схему, демонстрирующую возможности использования ММСК для активации регенерации быстрообновляющихся тканей в физиологических и экстремальных условиях у зрелых и старых лабораторных животных.

Влияние трансплантации ММСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях и при воздействии экстремальных факторов



## ВЫВОДЫ

1. В условиях возрастной инволюции отмечены более низкие показатели пролиферативной активности быстрообновляющихся тканей, как в физиологических условиях, так и при воздействии экстремальных факторов – ионизирующего излучения и острой кровопотери.

2. Трансплантация суспензии ММСК зрелым лабораторным животным в физиологических условиях оказывает стимулирующее действие на эритропоэз, а у старых животных происходит снижение количества цитогенетически измененных клеток и стимуляция эритропоэза.

3. Внутривенное введение суспензии ММСК зрелым лабораторным животным в условиях ионизирующего излучения и острой кровопотери оказывает стимулирующее действие на эритропоэз, гранулоцитопоэз, снижает индуцированный мутагенез, у старых животных происходит активация эритропоэза, снижение индуцированного мутагенеза.

4. В физиологических условиях и в условиях воздействия ИИ трансплантированные ММСК вызывают увеличение содержания криптального эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных. У зрелых лабораторных животных это происходит за счет повышения пролиферативной активности, в то время как у старых – за счет ингибирования апоптоза.

5. Старые лабораторные животные сохраняют способность при воздействии ММСК к активации регенерации быстрообновляющихся тканей, как в физиологических, так и в условиях воздействия экстремальных факторов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Маклакова И.Ю. Характеристика и аспекты использования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [Текст]/ И.Ю. Маклакова, Д.Ю.Гребнев, Е.В. Васильев // Вестник УГМА. – 2008. - выпуск 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 [Текст] / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, С.Е. Емельянова // IX международная научно – практическая конференция «Здоровье и образование в XXI веке»: сб. науч. тр. / Отв. Ред. И.О. Ф. – М., 2008. – Вып. 5. – С. 25-26.

3. **Ястребов А.П. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию миелоидной ткани в условиях воздействия ионизирующего излучения**

[Текст] / А.П. Ястребов, И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев, С.Е. Емельянова // Вестник уральской академической медицинской науки. – 2008. - № 4. – С. 89 – 93.

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

5. Гребнев Д.Ю. Возможности коррекции индуцированной мутагенной активности миелоидной ткани мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками [Текст] / Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Бондаренко О.А. // 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 [Текст] / 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. Маклакова И.Ю. Регенерация миелоидной ткани на фоне введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях пострадиационного повреждения [Текст] И.Ю. Маклакова // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов» - Новосибирск, 2009. – С. 235 – 237.

8. Гребнев Д.Ю. Коррекция возрастных изменений в миелоидной ткани старых лабораторных животных плацентарными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками [Текст] / 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.

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

10. Ястребов А.П. Изменения регенерации миелоидной ткани старых животных в условиях воздействия ионизирующего излучения

под влиянием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты [Текст] / А.П. Ястребов, И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев // Аллергология и иммунология. – 2009. - № 1. – С. 112.

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 [Текст] / И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев // Вестник РГМУ. – 2009. - № 3. – С. 47.

12. Маклакова И.Ю. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию миелоидной ткани и эпителия тощей кишки в условиях воздействия ионизирующего излучения [Текст] / И.Ю. Маклакова // Материалы 64- й всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». – Екатеринбург, 2009. – С. 168 – 170.

13. Маклакова И.Ю. Возможности коррекции пострadiационных повреждений эпителия тощей кишки у старых лабораторных животных с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [Текст] И.Ю. Маклакова, Д.Ю. Гребнев // Вестник РГМУ. – 2009. - № 3. – С. 46 - 47.

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

15. Решение о выдаче патента на изобретение, № 2008141199/13 (053346).

Способ снятия клеток с культуральной поверхности при проведении пассажа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [Текст] / Маклакова И.Ю., Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю.; заявитель и патентообладатель Екатеринбург. Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия» Фед ерального агентства по здравоохранению и социальному развитию (ГОУ ВПО УГМА РОСЗДРАВА). – заявл.16.10.2008.

16. Решение о выдаче патента на изобретение, №2008152842/14(069628). Способ восстановления миелоидной ткани старых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения [Текст] / Маклакова И.Ю., Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю.; заявитель и патентообладатель Екатеринбург. Государственное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» (ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий») – заявл.30.12.2008.

**УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ**

АИ – апоптотический индекс

БТШ – белки теплового шока

Гр.д.- гранулоцитарный дифферон

ИИ – ионизирующее излучение

КМ – костный мозг

МИ – митотический индекс

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

МЯТ – микроядерный тест

СКК – средняя клеточность крипты

СУМ – спонтанный уровень клеток с микроядрами

Эр.д. – эритроидный дифферон

Маклакова Ирина Юрьевна

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ  
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ, НА  
РЕГЕНЕРАЦИЮ БЫСТРООБНОВЛЯЮЩИХСЯ ТКАНЕЙ ЗРЕЛЫХ И  
СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ  
ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук