

ИЗМЕНЕНИЯ MORFOMETРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕЛЕЗЁНКИ СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФОНЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Дмитрий Юрьевич Гребнев^{1,2*}, Анатолий Петрович Ястребов², Ирина Юрьевна Маклакова^{1,2}

¹Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург,

²Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург

Реферат

Цель. Оценка морфометрических показателей селезёнки старых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения в дозе 4 Гр на фоне трансплантации мультипотентных мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток.

Методы. Эксперимент выполнен на 72 белых лабораторных мышках-самцах в возрасте 3 лет с массой тела 50 г. Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки и гемопоэтические стволовые клетки выделяли от 8 лабораторных животных мышьяк-самок в возрасте 3–4 мес с массой тела 30 г, срок гестации 14 дней. В первой группе (n=36) животным опытной подгруппы (n=18) через 1 ч после облучения однократно внутривенно вводили суспензию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и гемопоэтических стволовых клеток соответственно в дозе 6 млн клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, животным контрольной подгруппы (n=18) внутривенно вводили 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Во второй группе по аналогичному алгоритму исследовали две подгруппы по 18 мышей, не подвергшихся облучению. На 1-е и 7-е сутки из эксперимента выводили по 9 животных. В гистологических препаратах селезёнки с помощью морфометрической программы «BioVision 2008» определяли общую площадь лимфоидного фолликула, площадь Т-зоны лимфоидного фолликула, площадь В-зоны лимфоидного фолликула, общую клеточность красной пульпы, а также содержание эритроцитов и лейкоцитов в красной пульпе.

Результаты. Показано, что на 7-е сутки после лучевой нагрузки на фоне трансплантации стволовых клеток происходит восстановление до значений нормы площади тимус-независимой зоны лимфоидного фолликула. Эффект от трансплантации мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и гемопоэтических стволовых клеток также проявлялся в увеличении плотности клеток в красной пульпе. При изучении содержания эритроидных клеток и клеток белой крови в красной пульпе селезёнки не выявлено существенного изменения этих показателей по сравнению с контрольной подгруппой. В то же время произошло восстановление содержания лейкоцитов в красной пульпе селезёнки до значений нормы.

Вывод. Восстановление основных морфометрических показателей в селезёнке у старых лабораторных животных в условиях лучевой нагрузки может объясняться усилением хоуминга колониеобразующих единиц селезёнки, последующей активацией экстрамедуллярного кроветворения в селезёнке, реализацией антиапоптогенного действия мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, стволовые клетки, морфометрические показатели селезёнки, старение.

THE CHANGE OF SPLENIC MORPHOMETRIC PARAMETERS IN AGED LABORATORY ANIMALS EXPOSED TO IONIZING RADIATION AFTER UNDERGOING STEM CELLS TRANSPLANTATION

D.Yu. Grebnev^{1,2}, A.P. Yastrebov², I.Yu. Maklakova^{1,2}. ¹Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia, ²Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia.

Aim. To study the changes of splenic morphometric parameters in aged laboratory animals exposed to ionizing radiation in the dose of 4Gr after multipotent mesenchymal and hematopoietic stem cells transplantation. **Methods.** The experiments were conducted on 72 white male laboratory mice at the third year of life with the body weight of 50 g. Multipotent mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells were obtained from 8 laboratory female mice with the body weight of 30 g aged 3–4 months, the gestation term was 14 days. The first group (36 animals exposed to radiation) was subdivided to 2 subgroups of 18 animals each. The suspension of multipotent mesenchymal stem cells (6 000 000 cells/kg) and hematopoietic stem cells (330 000 cells/kg) was introduced as single intravenous injection to the experimental subgroup (18 animals) 1 hour after the animals were exposed to radiation. The animals of control subgroup (18 animals) were injected 0.2 ml of normal saline. The second group included two subgroups 18 mice each that underwent the same procedure without being exposed to radiation. 9 animals from each group were withdrawn from the study at 1st and 7th day each. The lymphoid follicle gross area, area of the T-cell and B-cell zones, general numbers of cells in the red pulp of spleen, including erythrocyte and lymphocyte count, were measured in splenic histologic specimens using the morphometric «BioVision 2008» software. **Results.** It was shown that on the 7th day after exposure to ionizing radiation followed by stem cells transplantation, the area of thymus-independent zone of lymphoid follicle restored back to normal ranges. The effect of multipotent mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells transplantation also resulted in the increase of the number of cells in the red pulp of spleen. There were no significant changes observed in numbers of erythroid cells and white blood cells in the spleen red pulp compared to control subgroup. At the same time, the leukocyte number in the red pulp of spleen restored to normal values. **Conclusion.** The restoration of the basic morphometric parameters in spleen of aged laboratory animals exposed to ionizing radiation may be explained by increased homing of splenic colony-forming units with subsequent activation of extramedullary hematopoiesis in spleen, and apoptosis-reducing effect of multipotent mesenchymal stem cells.

Keywords: ionizing radiation, stem cells, splenic morphometric parameters, ageing.

Одно из очень быстро развивающихся направлений в области борьбы со старением — регенеративная медицина и моделирование тканей. Известно, что способность стволовых клеток к самообновлению и дифференцировке с возрастом снижается. Это ведёт, с одной стороны, к истощению пула стволовых клеток, а с другой — к уменьшению количества выделяемых ими факторов [2, 8, 9]. В связи с этим на сегодняшний день можно выделить два направления антивозрастной терапии: терапия стволовыми клетками и трофическими факторами.

Проведённые ранее в нашей лаборатории эксперименты позволили установить существенное влияние сочетанной трансплантации стволовых клеток — мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), выделенных из плаценты, — на регенерацию быстро обновляющихся тканей (миелоидной ткани и эпителия кишечника) [1, 6, 7]. С целью получения новых данных о механизме действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на быстро обновляющиеся ткани в возрастном аспекте в настоящем исследовании были проведены эксперименты на старых лабораторных животных в физиологических условиях и после воздействия ионизирующего излучения.

Эксперименты по изучению изменений морфометрических показателей селезёнки старых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения на фоне трансплантации стволовых клеток выполнены на 36 белых лабораторных мышках-самцах в возрасте 3 лет с массой тела 50 г. Плацентарные ММСК и ГСК выделены от 8 лабораторных мышей-самок в возрасте 3–4 мес с массой тела 25–30 г, срок гестации 14 дней [3–5].

Методика SCA-1-позитивной иммуномагнитной сепарации

1. Первичная клеточная суспензия суспендирована в рекомендованном растворе в концентрации 100 млн клеток в 1 мл буфера для иммуномагнитной сепарации («StemCell Technologies», США). Состав рекомендованного раствора: фосфатный буфер без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (pH=7,4), 2% раствор фекальной бычьей сыворотки с 1 ммоль этилендиаминтетрауксусной кислоты.

2. Клетки помещены в пробирку из полистирена ёмкостью 5 мл.

3. Добавлены первичные биотинилированные антитела «SCA-1 PE Labeling Reagent» («StemCell Technologies», США) в концентрации 50 мкл на 1 мл клеточной суспензии. Суспензия была пипетирована и инкубирована при комнатной температуре в течение 15 мин.

4. Добавлены вторичные антитела «EasySep PE Selection Cocktail» («StemCell Technologies», США) в концентрации 70 мкл на 1 мл клеточной суспензии, способные специфически связываться с биотином первичных антител. Суспен-

зия была пипетирована и инкубирована при комнатной температуре в течение 15 мин.

5. Добавлены покрытые декстраном наночастицы железа («StemCell Technologies», США) в концентрации 50 мкл на 1 мл клеточной суспензии, способные связываться с вторичными антителами. Суспензия была пипетирована и в дальнейшем инкубирована при комнатной температуре в течение 10 мин.

6. Клеточная суспензия была доведена до объёма 2,5 мл с использованием буфера для иммуномагнитной сепарации. После пипетирования данная пробирка была помещена в магнит («StemCell Technologies», США). Время инкубации в магните составило 5 мин.

7. Перевернув магнит с находящейся в нём пробиркой и удерживая его в таком положении 2–3 с, из пробирки удаляли SCA-1-отрицательную фракцию клеток.

8. Поставив магнит и вынув из него пробирку, повторно добавляли в нее 2,5 мл буфера для иммуномагнитной сепарации. После пипетирования данная пробирка была помещена в магнит. Время инкубации в магните составило 5 мин.

9. Этапы прямой иммуномагнитной сепарации №6 и №7 были повторены дважды.

Выделенная таким образом фракция, положительная по маркёру ГСК, была подвергнута дальнейшим исследованиям.

Методика CD117-позитивной иммуномагнитной сепарации

1. Первичная клеточная масса суспендирована в рекомендованном растворе в концентрации 100 млн клеток в 1 мл буфера для иммуномагнитной сепарации («StemCell Technologies», США). Состав рекомендованного раствора: фосфатный буфер без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (pH=7,4), 2% раствор фекальной бычьей сыворотки с 1 ммоль этилендиаминтетрауксусной кислоты.

2. Клетки помещены в пробирку из полистирена ёмкостью 5 мл.

3. Добавлены первичные биотинилированные антитела «CD 117 PE Labeling Reagent» («StemCell Technologies», США) в концентрации 50 мкл на 1 мл клеточной суспензии. Суспензия была пипетирована и в дальнейшем инкубирована при комнатной температуре в течение 15 мин.

4. Добавлены вторичные антитела «EasySep PE Selection Cocktail» («StemCell Technologies», США) в концентрации 70 мкл на 1 мл клеточной суспензии, способные специфически связываться с биотином первичных антител. Суспензия была пипетирована и инкубирована при комнатной температуре в течение 15 мин.

5. Добавлены покрытые декстраном наночастицы железа («StemCell Technologies», США) в концентрации 50 мкл на 1 мл клеточной суспензии, способные связываться с вторичными антителами. Суспензия была пипетирована и инкубирована при комнатной температуре в те-

Морфометрические показатели селезёнки старых мышей без воздействия ионизирующего излучения ($M \pm m$)

Параметры	1-е сутки эксперимента		7-е сутки эксперимента	
	Введение 0,9% раствора натрия хлорида (n=9)	Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК (n=9)	Введение 0,9% раствора натрия хлорида (n=9)	Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК (n=9)
Площадь лимфоидного фолликула, $\text{мкм}^2 \times 10^5$	0,63±0,05	0,60±0,07	0,6±0,04	0,63±0,06
Площадь В-зоны, $\text{мкм}^2 \times 10^5$	0,58±0,04	0,53±0,04	0,55±0,04	0,52±0,04
Площадь Т-зоны, $\text{мкм}^2 \times 10^5$	0,055±0,006	0,055±0,01	0,058±0,007	0,060±0,009
Расстояние между центрами фолликулов, мкм	285,43±7,80	282,00±9,43	281,43±8,49	276,43±9,63
Общая клеточность красной пульпы на 0,01 мм^2	184,29±10,98	175,14±8,45	179,43±8,08	188,71±15,10
Содержание эритроцитов в красной пульпе на 0,01 мм^2	108,71±10,24	100,71±10,24	104,71±6,90	106,43±8,37
Содержание лейкоцитов в красной пульпе на 0,01 мм^2	73,86±4,73	73,86±4,73	72,86±7,31	74,43±8,78

Примечание: ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ГСК – гемопоэтические стволовые клетки.

чение 10 мин.

6. Клеточная суспензия была доведена до объёма 2,5 мл с использованием буфера для иммуномагнитной сепарации. После проведённого пипетирования данная пробирка была помещена в магнит («StemCell Technologies», США). Время инкубации в магните составило 5 мин.

7. Перевернув магнит с находящейся в нём пробиркой и удерживая его в таком положении 2–3 с, удаляли из пробирки CD117-отрицательную фракцию клеток.

8. Поставив магнит и вынув из него пробирку, повторно добавляли в нее 2,5 мл буфера для иммуномагнитной сепарации. После проведённого пипетирования данная пробирка была помещена в магнит. Время инкубации в магните составило 5 мин.

9. Этапы прямой иммуномагнитной сепарации №6 и №7 повторяли дважды.

Выделенная фракция, положительная по маркеру ГСК CD117, была подвергнута дальнейшим исследованиям.

Изучали воздействие ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр на 72 старых лабораторных животных, при этом были выделены первая (36 животных) и вторая (36 животных) группы. На первую группу воздействовали ионизирующим излучением. Вторую группу составили животные, не подвергшиеся облучению. В каждой группе были выделены опытная (18 животных) и контрольная (18 животных) подгруппы. Животным опытных подгрупп внутривенно вводили суспензию ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, контрольным подгруппам внутривенно вводили 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Внутривенные введения осуществляли через 1 ч после облучения однократно. Забой животных выполняли на 1-е и 7-е сутки после облучения.

Гистологические препараты селезёнки анализировали с помощью микроскопа «Micros MC-50» (Австрия) при увеличении $\times 40$, а также с помощью морфометрической программы «BioVision 2008». Проводили анализ общей площади лимфоидного фолликула, площади Т-зоны лимфоидного фолликула, площади В-зоны лимфоидного фолликула, определяли общую клеточность красной пульпы, а также содержание эритроцитов и лейкоцитов в ней.

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую величину и стандартную ошибку среднего. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Морфометрические показатели животных второй группы (не подвергшихся воздействию ионизирующего излучения) на 1-е и 7-е сутки эксперимента представлены в табл. 1.

На 1-е сутки после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при проведении морфометрического исследования селезёнки старых лабораторных мышей установлено, что изучаемые показатели существенно не отличались от данных, полученных в контрольной подгруппе (табл. 2).

При проведении гистологического исследования на 7-е сутки после воздействия ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр на фоне трансплантации стволовых клеток выявлено восстановление площади лимфоидного фолликула до значений нормы. При анализе площади В-зоны лимфоидного фолликула установлен эффект от введения стволовых клеток в виде увеличения данного показателя относительно контрольной подгруппы и в то же время его восстановление до значений нормы. Обнаружено

Морфометрические параметры селезёнки старых мышей после воздействия ионизирующего излучения (ИИ) в дозе 4,0 Гр (M±m)

Параметры	1-е сутки после воздействия ИИ		7-е сутки после воздействия ИИ	
	Введение 0,9% раствора натрия хлорида (n=9)	Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК (n=9)	Введение 0,9% раствора натрия хлорида (n=9)	Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК (n=9)
Площадь лимфоидного фолликула, мкм ² ×10 ⁵	0,46±0,05*	0,48±0,08*	0,51±0,05*	0,53±0,06
Площадь В-зоны, мкм ² ×10 ⁵	0,42±0,055*	0,41±0,078*	0,43±0,057*	0,51±0,048**
Площадь Т-зоны, мкм ² ×10 ⁵	0,039±0,006*	0,04±0,008*	0,045±0,007*	0,046±0,005*
Расстояние между центрами фолликулов, мкм	215,14±10,41*	219,57±13,22*	226,71±3,67*	235,86±8,45*
Общая клеточность красной пульпы на 0,01 мм ²	131,00±8,00*	126,71±7,76*	146,71±10,82*	162,71±6,24*,**
Содержание эритроцитов в красной пульпе на 0,01 мм ²	82,43±10,37*	77,43±7,92*	146,71±10,82*	87,14±4,73*
Содержание лейкоцитов в красной пульпе на 0,01 мм ²	56,57±6,94*	59,14±6,98*	62,57±5,51*	65,14±6,12

Примечание: *отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа) $p < 0,05$; **отличие от подгруппы старых интактных животных после воздействия ионизирующего излучения (контрольная подгруппа) $p < 0,05$; ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ГСК – гемопоэтические стволовые клетки.

увеличение плотности клеток в красной пульпе селезёнки, восстановление лейкоцитов в красной пульпе до значений нормы (см. табл. 2).

Проведённый на старых лабораторных животных эксперимент свидетельствует о наличии эффекта от сочетанной трансплантации стволовых клеток (ММСК и ГСК) на 7-е сутки после лучевой нагрузки. Этот эффект проявляется в восстановлении до значений нормы площади тимус-независимой зоны лимфоидного фолликула. Выраженное действие от трансплантации ММСК и ГСК также проявляется в увеличении плотности клеток в красной пульпе. Тем не менее, при изучении содержания эритроидных клеток и клеток белой крови в красной пульпе селезёнки не выявлено существенного изменения этих показателей по сравнению с контрольной подгруппой. В то же время следует отметить, что произошло восстановление содержания лейкоцитов в красной пульпе селезёнки до значений нормы.

Известно, что с возрастом происходит уменьшение способности клеток к миграции и дифференцировке колониеобразующих единиц селезёнки, расположенных в костном мозге. Усилить миграцию аллогенных и собственных колониеобразующих единиц селезёнки способны трансплантированные ММСК за счёт выработки ими хемоаттрактанта для ГСК – SDF-1. Способность трансплантированных ММСК усиливать синтез антиапоптогенных факторов (HIF-1α) может определить сохранение клеток в красной пульпе, что определялось нами как повышение плотности клеток в красной пульпе селезёнки.

ВЫВОД

Таким образом, усилением хоуминга колониеобразующих единиц селезёнки, последующей активацией экстрамедуллярного кроветворения в селезёнке, реализацией антиапоптогенного действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток можно объяснить восстановление основных морфометрических показателей в селезёнке у старых лабораторных животных в условиях лучевой нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Васильев Е.В. Характеристика и аспекты использования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Вест. УГМА. – 2008. – Выпуск 16. – С. 36–39.
2. Сериков В.Б., Куёперс Ф. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток // Клеточн. трансплантол. и тканев. инженерия. – 2008. – Т. III, №2. – С. 51–56.
3. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Сазонов С.В. и др. Изменение основных морфометрических показателей селезёнки на фоне трансплантации стволовых клеток в условиях острой кровопотери // Клеточн. трансплантол. и тканев. инженерия. – 2012. – Т. VII, №2. – С. 55.
4. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Экспериментальное обоснование использования сочетанной трансплантации стволовых клеток для коррекции регенерации быстрообновляющихся тканей после лучевого повреждения // Вестн. Урал. мед. академич. науки. – 2012. – №2 (39). – С. 141.
5. Reyes M., Verfaillie C.M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells // Ann. NY Acad. Sci. – 2001. – Vol. 938. – P. 231–235.
6. Wagers A.J., Weissman I.L. Plasticity of adult stem cells // Cell. – 2004. – Vol. 116. – P. 639–648.