

УДК 616.411-008.6-092.4:615.361:611.018.1

В.В. Ліходієвський^{1,*}, А.В. Корсак¹, Д.М. Іродов², Ю.Б. Чайковський¹,
В.А. Кордюм², С.С. Олефір¹, А.О. Забіла¹, М.В. Ковальчук², Т.А. Рубан², Н.С. Шувалова²

Морфологічні особливості селезінки за умов експериментальної моделі поліорганної недостатності та застосування стовбурових клітин

UDC 616.411-008.6-092.4:615.361:611.018.1

V.V. Likhodiievskiy^{1,*}, A.V. Korsak¹, D.M. Irodov², Yu.B. Chaikovskiy¹, V.A. Kordium²,
S.S. Olefir¹, A.O. Zabila¹, M.V. Kovalchuk², T.A. Ruban², N.S. Shuvalova²

Spleen Morphological Features Under Experimental Model of Multiple Organ Failure and Stem Cell Application

Ключові слова: регенерація, синдром поліорганної недостатності, мезенхімальні стовбурові клітини.

Ключевые слова: регенерация, синдром полиорганной недостаточности, мезенхимальные стволовые клетки.

Key words: regeneration, multiple organ failure, mesenchymal stem cells.

Синдром поліорганної недостатності (СПОН) – це сукупність патологічних змін, які призводять до термінальної стадії функціонування багатьох органів і характеризується таким ступенем ураження органів, при якому вони не здатні підтримувати життєзабезпечення організму. На даний час не розроблено чітких клінічних рекомендацій та дієвих засобів лікування наслідків СПОН.

У експерименті розроблено модель системного ураження організму тетрахлорметаном [4], яка ґрунтується на відтворенні оксидативного стресу, що викликає розвиток СПОН у людини [6] і супроводжується патологічними змінами печінки, легенів, нирок та селезінки [1, 5].

На сучасному етапі розвитку медицини для корекції різних патологій перспективним об'єктом використання вважаються мезенхімальні фібробластоподібні стовбурові клітини, оскільки вони є мультипотентними, здатні до диференціації в клітини органів мезодермального походження і можуть бути легко отримані з різних джерел [3]. Існують повідомлення про успішне застосування мезенхімальних стовбурових клітин із метою лікування цирозу печінки, рубцевих змін міокарда [3]. На даний час є небагато відомостей щодо морфологічних змін селезінки за умов СПОН та застосування стовбурових клітин для відновлення функції селезінки.

У зв'язку із вищевикладеним метою роботи було дослідження морфологічних особливостей селезінки

Multiple organ failure syndrome (MOFS) is a complex of pathological changes, resulting in terminal stage of functioning in many organs, being characterized by such a degree of organ damage, when they are unable to support the body life. To date there are no clear clinical guidelines and efficient therapeutic products to treat MOFS consequences have been designed.

In the experiment we developed the model of systemic damage of a body with tetrachloromethane [4], based on reproducing of oxidative stress, which caused MOFS development in human [6], being accompanied by pathological changes in liver, lungs, kidneys and spleen [1, 5].

At current state of medicine one considers mesenchymal fibroblast-like stem cells to be promising in correction of various pathologies because of their multipotency, capability of differentiating into cells of mesodermal organs and a simple procurement from different sources [3]. There are the reports about a successful use of mesenchymal stem cells to treat liver cirrhosis, cicatricial changes in myocardium [3]. Now, there is only scarce information about morphological changes in spleen under MOFS and stem cell application for splenic function restoration.

In this context the research aim was to study the morphological features of spleen under experimental simulation of MOFS and stem cell administration.

Research was performed in 2–3-month-old ICR mice ($n = 45$), weighing 22–24 g. Animals were divided into

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

бульв. Т. Шевченка, 13, м. Київ 01601;
тел.: (+38 044) 454-49-89
електронна пошта: Legebrill@gmail.com

Надійшла 26.01.2018

Прийнята до друку 19.02.2018

© 2018 V.V. Likhodiievskiy et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

¹Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

²Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

13, T. Shevchenko ave., Kyiv, Ukraine 01601;
tel.: +380 44 454 4989
e-mail: Legebrill@gmail.com

Received January, 26, 2018

Accepted February, 19, 2018

за умов експериментального моделювання СПОН та введення стовбурових клітин.

Роботу виконували на 2–3-місячних мишах ($n = 45$) лінії ICR, масою 22–24 г. Тварин розділили на групи. Контрольну групу ($n = 5$) склали тварини, яким внутрішньовенно вводили 0,3 мл 0,9%-го розчину NaCl, без моделювання патології. Тваринам експериментальної групи 1 ($n = 20$) моделювали поліорганну недостатність внутрішньоочеревинним введенням 0,3 мл 30%-го масляного розчину тетрахлорметану 2 рази на тиждень протягом 12 тижнів.

Мишам експериментальної групи 2 ($n = 20$) одразу ж після закінчення моделювання СПОН (внутрішньоочеревинне введення 0,3 мл 30%-го масляного розчину тетрахлорметану 2 рази на тиждень протягом 12 тижнів) однократно внутрішньовенно вводили 1×10^4 ембріональних мезенхімальних фібробластоподібних стовбурових клітин мишей лінії ICR, носіїв гену GFP. Використовували вказану дозу мезенхімальних фібробластоподібних стовбурових клітин мишей лінії ICR, оскільки результати попередніх досліджень довели, що введення більшої їх концентрації недоцільне [2].

Первинну культуру мишиних ембріональних клітин отримували з м'яких тканин 15–17-денних ембріонів мишей. Фрагменти тканин витримували в розчині пеніциліну та стрептоміцину, обробляли трипсином, ресуспендували та висівали на середовище DMEM. У експерименті використовували клітини не вище другого пасажу.

Через 3 та 9 тижнів після введення стовбурових клітин усіх тварин виводили з експерименту. Для гістологічного аналізу забирали фрагменти селезінки. Після стандартної їх обробки виготовляли парафінові зрізи, які забарвлювали гематоксиліном та еозинном. Мікропрепарати досліджували на мікроскопі «Olympus BX51» («Olympus», Японія). Мікрофотографії аналізували за допомогою програми аналізу біомедичних зображень «ImageJ v. 1.50.» («National Institutes of Health», США). Морфометрично визначали середню площу лімфоїдних фолікулів, питому площу білої пульпи.

Утримання тварин, маркування та необхідні маніпуляції виконували з дотриманням принципів біоетики та положень Директиви 2010/63/EU Ради Європи та Європейського парламенту «Щодо захисту лабораторних тварин, які використовуються з науковою метою».

Отримані цифрові дані обробляли за допомогою статистичного пакету «GNU PSPP» («Free software foundation», США) із перевіркою на нормальність розподілу за критерієм Колмогорова-Смирнова, а також критерієм Крускала-Уолліса, для порівнянням ознак

groups. The control group ($n = 5$) comprised the animals with intravenous injection of 0.3 ml of 0.9% NaCl, with no pathology simulation. In animals of experimental group 1 ($n = 20$) we simulated a multiple organ failure via intraperitoneal administration of 0.3 ml of a 30% tetrachloromethane oil solution twice a week for 12 weeks. Immediately after completing MOFS simulation (intraperitoneal administration of 0.3 ml of a 30% tetrachloromethane oil solution twice a week for 12 weeks) the mice of experimental group 2 ($n = 20$) were intravenously injected with 1×10^4 embryonic mesenchymal fibroblast-like stem cells of ICR mice, GFP gene carriers. We used here just the mentioned dose of mesenchymal fibroblast-like stem cells of ICR mice, since their higher concentration was proven to be inexpedient in previous findings [2].

The primary cell culture was derived from soft tissues of 15–17-day murine embryos. The tissue fragments were kept in Penicillin and Streptomycin solution, treated with trypsin, resuspended and inoculated in DMEM. The cells from cultures not older than passage 2 were used in the experiment.

In 3 and 9 weeks after stem cell administration, all the animals were sacrificed. Spleen fragments were taken for histological analysis. After their standard treatment, the paraffin sections were prepared, further stained with hematoxylin and eosin. The micropreparations were analyzed with microscope Olympus BX51 (Olympus, Japan). Microphotographs were processed by the Image J (version 1.50) software (National Institutes of Health, USA). An average area of lymphoid follicles and a specific one of white pulp were determined morphometrically.

Animal housing, labeling and necessary manipulations were carried out in compliance with bioethical principles and provisions of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council 'On the Protection of Animals Used for Scientific Purposes'.

The obtained digital data was processed using the software for statistical analysis GNU PSPP (Free Software Foundation, USA). The normal distribution was verified with the Kolmogorov-Smirnov test and Kruskal-Wallis one as well. The Mann-Whitney U test was used to compare the characteristics between the groups.

The analysis of spleen histological preparations of animals of control group demonstrated the spleen parenchyma to be of a normal structure, consisted of red and white pulp (Fig. 1). In spleen of the animals control group the white pulp area was 53.49%. The amount of connective tissue was minimal. The white pulp was represented by medium-sized follicles (lymph nodes) and periarterial sheaths. An average area of follicle was $(75,667.24 \pm 4,389.65) \mu\text{m}^2$. The red pulp was formed by Billroth' strands and venous sinuses.



між групами використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні.

Аналіз гістологічних препаратів селезінки тварин контрольної групи виявив, що паренхіма селезінки мала нормальну будову і складалася із червоної та білої пульпи (рис. 1). В селезінці тварин контрольної групи площа білої пульпи дорівнювала 53,49%. Кількість сполучної тканини мінімальна. Біла пульпа представлена фолікулами середнього розміру (лімфатичні вузлики) та періартеріальними піхвами. Середня площа фолікула складала $(75667,24 \pm 4389,65)$ мкм². Червона пульпа формувалася селезінковими тяжами Більрота і венозними синусами.

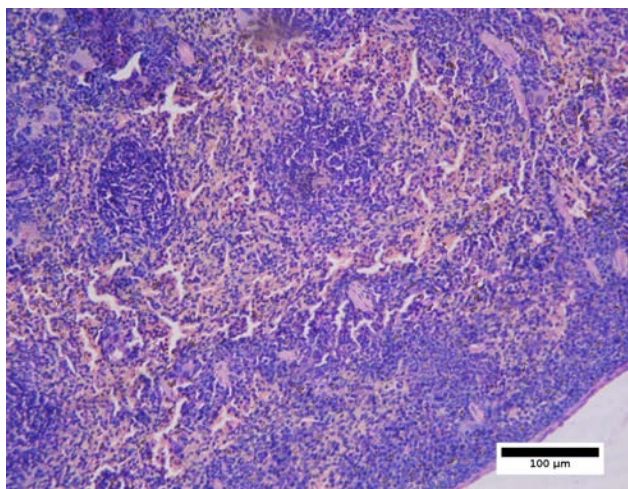


Рис. 1. Селезінка. Контроль. Нормальне співвідношення червоної та білої пульпи. Чітко визначається світлий гермінативний центр. Забарвлення гематоксилином та еозином.

Fig. 1. Spleen. Control. Normal ratio of red and white pulp. Clear light germinal center is distinctly revealed. Staining with hematoxylin and eosin.

На гістологічних препаратах селезінки тварин експериментальної групи 1 виявлено, що паренхіма складалась із червоної та білої пульпи. Морфологічна структура селезінки тварин даної групи мала ознаки атрофії, які були більш виражені через 3 тижні після останньої ін'єкції тетрахлорметану та збереглися на 9-му тижні (рис. 2). На 3-му тижні площа білої пульпи складала 42,0% і зменшилася до 37,2% на 9-му тижні. Розмір фолікулів зменшений, в них були наявні незначні ділянки фіброзу. Середня площа фолікула на 3-му тижні складала $(48591,74 \pm 2229,70)$ мкм², що значуще менше, ніж у тварин контрольної групи ($p < 0,05$). На 9-му тижні після закінчення моделювання СПОН середня площа фолікулів складала $(25413,46 \pm 4808,64)$ мкм², що значуще менше порівняно з попереднім терміном спостереження ($p < 0,05$). Червона пульпа мала ознаки фіброзу.

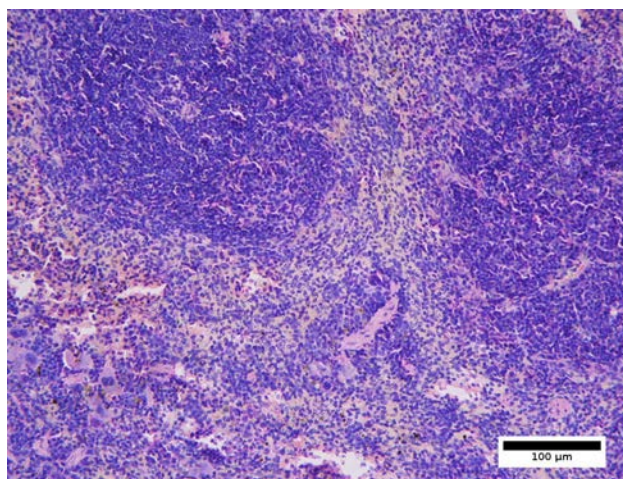


Рис. 2. Селезінка з ознаками атрофії. Модель СПОН через 9 тижнів після закінчення моделювання. Порушене співвідношення червоної та білої пульпи в бік зменшення кількості останньої. Фолікули зморщені. Кількість клітинних елементів зменшена. Забарвлення гематоксилином та еозином.

Fig. 2. Spleen with atrophy signs. MOFS model 9 weeks after finishing the simulation. Distorted ratio of red and white pulp towards the reduced amount of white pulp. Follicles are shrunk. Reduced number of cell elements. Staining with hematoxylin and eosin.

In sections of the animals spleen of experimental group 1 the parenchyma was revealed to consist of red and white pulp. The morphological structure of spleen of animals in this group had signs of atrophy, which were more pronounced in 3 weeks after last injection of tetrachloromethane and were kept to week 9 (Fig. 1). To week 3 the area of white pulp was 42.0% and decreased down to 37.2% to week 9. The size of follicles was reduced, and there were insignificant areas of fibrosis in them. An average area of follicle to week 3 was $(48,591.74 \pm 2,229.70)$ μm², being significantly lower than in the animals of control group ($p < 0.05$). To week 9 after completing the MOFS simulation, the average area of follicles was $(25,413.46 \pm 4,808.64)$ μm², which was significantly lower than in previous observation period ($p < 0.05$). The red pulp had signs of fibrosis.

In animals spleen of experimental group 2, subjected to the MOFS model and stem cell administration, the histological sections, stained with hematoxylin and eosin, demonstrated a typical pathomorphological picture of reactive changes and signs of antigenic stimulation in 3 and 9 weeks after the last injection of tetrachloromethane. To week 3 after completing MOFS simulation and stem cell administration, a part of white pulp from the cutting area was 64.5% with a decrease down to 62.4% to week 9. The follicles in spleen had a large size and dark color, and the fibrosis zones were practically absent in them. The average area of spleen follicles 3 weeks



У селезінці тварин експериментальної групи 2, з моделлю СПОН та введенням стовбурових клітин, на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксилином і еозином, через 3 та 9 тижнів після останньої ін'єкції тетрахлорметану виявлено типову патоморфологічну картину реактивних змін та ознаки антигенної стимуляції. На 3-му тижні після закінчення моделювання СПОН та введення стовбурових клітин частка білої пульпи від площі зрізу складала 64,5% із зменшенням до 62,4% на 9-му тижні. Фолікули в селезінці мали великий розмір та темний колір, зони фіброзу у них практично відсутні. Середня площа фолікулів селезінки через 3 тижні після введення стовбурових клітин складала $(93635,66 \pm 12765,69)$ мкм², що значуще більше, ніж у тварин групи 1 ($p < 0,05$). На 9-му тижні середній розмір фолікулів складав $(77467,09 \pm 7535,83)$ мкм², що значуще менше, ніж на попередньому терміні спостереження, значуще більше, ніж у тварин попередньої групи ($p < 0,05$), та не відрізнявся від контролю ($p = 0,23$). При цьому у біологічному матеріалі тварин, який досліджували через 9 тижнів після ін'єкції, розмір фолікулів наближався до норми, а щільність клітин білої пульпи збільшилася (рис. 3). Червона пульпа була щільно заповнена клітинними елементами.

Атрофія білої пульпи та зменшення кількості клітин лімфоцитарного ряду в селезінці тварин із моделлю СПОН, можливо, є ознакою виснаження імунної системи та свідчить про міграцію клітинних елементів до уражених органів (печінка, легені, нирка). Відновлення структури фолікулів та збільшення кількості лімфоцитів білої пульпи в селезінці тварин із моделлю СПОН та введенням стовбурових клітин свідчать про активацію імунної відповіді.

Таким чином, встановлені морфологічні зміни у селезінці тварин контрольної та обох експериментальних груп опосередковано свідчать про імуномодулюючий вплив мезенхімальних стовбурових клітин на організм після моделювання поліорганної недостатності введенням тетрахлорметану. Перспективою подальших досліджень є визначення присутності введених стовбурових клітин у різних органах за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Література

1. Ferrari R.S., Tieppo M., Rosa D.P. et al. Lung and liver changes due to the induction of cirrhosis in two experimental models. *Arq Gastroenterol* 2013; 50 (3): 208–213.
2. Kim Y., Kim J., Huh J. et al. The therapeutic effects of optimal dose of mesenchymal stem cells in a murine model of an elastase induced-emphysema. *Tuberc Respir Dis* 2015; 78(3): 239.

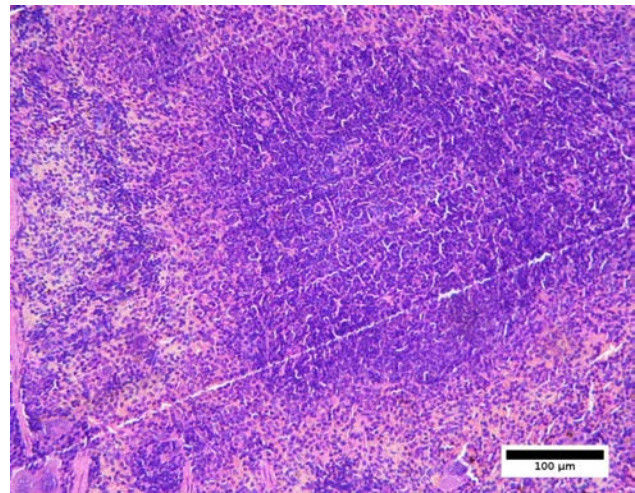


Рис. 3. Селезінка з ознаками активації імунної відповіді. Введення стовбурових клітин 1×10^4 . Забір матеріалу через 9 тижнів після ін'єкції. Лімфатичні вузлики виглядають темними за рахунок збільшення щільності клітин білої пульпи. За розмірами фолікул наближається до контролю. Забарвлення гематоксилином та еозином.

Fig. 3. Spleen with immune response activation signs. Introduction of stem cells of 1×10^4 . Material was harvested 9 weeks after injection. Lymph nodes look due to a rise in the density of white pulp cells. On its dimensions the follicle is approaching to the control. Staining with hematoxylin and eosin.

after stem cell injection was $(93,635.66 \pm 12,765.69) \mu\text{m}^2$, which was significantly higher than in animals group 1 ($p < 0.05$). To week 9 the average size of follicles was $(77,467.09 \pm 7,535.83) \mu\text{m}^2$, which was significantly lower vs. the previous observation period, and significantly higher than in animals of previous group ($p < 0.05$), and did not differ from the control ($p = 0.23$). Herewith in biological material of animals, studied in 9 weeks after injection, the size of follicles approached the norm, and the cell density of white pulp increased (Fig. 3). The red pulp was densely filled with cell elements.

The white pulp atrophy and a decreased number of lymphocyte series in spleen of animals with MOFS model may be a sign of the immune system depletion and indicate the migration of cell elements to affected organs (liver, lung, kidney). Restoring the follicle structure and increasing a number of white pulp lymphocytes in spleen of animals with simulated MOFS and administered stem cells testified to the activation of immune response.

Thus, the established morphological changes in animals spleen of control and both experimental groups indirectly testified to immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on a body after simulating multiple organ failure via tetrachloromethane introduction. Further determination of the presence of administered stem cells in different organs using fluorescence microscopy is promising.

3. Kobolak J., Dinnyes A., Memic A. et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* 2016; 99: 62–68.
4. Kordium V., Chaikovskiy Y., Irodov D. et al. Modelling of systemic lesion of organism for development of multitarget cellular and cytokine therapy. *Biopolymers and Cell* 2016; 32(5): 381–394.
5. Ricon A.R., Covarrubias A., Pedraza-Chaverri J. et al. Differential effect of CCl 4 on renal function in cirrhotic and non-cirrhotic rats. *Exp Toxic Pathol* 1999; 51: 199–205.
6. Rogobete A., Sandesc D., Papurica M. et al. The influence of metabolic imbalances and oxidative stress on the outcome of critically ill polytrauma patients: a review. *Burns & Trauma*. 2017; 5(1): 256–234.

References

1. Ferrari R.S., Tieppo M., Rosa D.P. et al. Lung and liver changes due to the induction of cirrhosis in two experimental models. *Arq Gastroenterol* 2013; 50 (3): 208–213.
2. Kim Y., Kim J., Huh J. et al. The therapeutic effects of optimal dose of mesenchymal stem cells in a murine model of an elastase induced-emphysema. *Tuberc Respir Dis* 2015; 78(3): 239.
3. Kobolak J., Dinnyes A., Memic A. et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* 2016; 99: 62–68.
4. Kordium V., Chaikovskiy Y., Irodov D. et al. Modelling of systemic lesion of organism for development of multitarget cellular and cytokine therapy. *Biopolymers and Cell* 2016; 32(5): 381–394.
5. Ricon A.R., Covarrubias A., Pedraza-Chaverri J. et al. Differential effect of CCl 4 on renal function in cirrhotic and non-cirrhotic rats. *Exp Toxic Pathol* 1999; 51: 199–205.
6. Rogobete A., Sandesc D., Papurica M. et al. The influence of metabolic imbalances and oxidative stress on the outcome of critically ill polytrauma patients: a review. *Burns & Trauma* 2017; 5(1): 256–234.

