

УДК 612.683:612.41-003:616-073.7-089.819.843:612.014:616-092.4

© А.П. Ястребов, Д.Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова, 2012.

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ЛУЧЕВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НА ФОНЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**А.П. Ястребов, Д.Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова**

*Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Уральская Государственная Медицинская Академия Минздравоохранения России, государственное Учреждение здравоохранения Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» г. Екатеринбург, Россия.*

### THE RECONSTRUCTION OF MYELOID TISSUE REGENERATION IN OLD LABORATORY ANIMALS AFTER THE RADIATION DAMAGE ON THE BACKGROUND OF STEM CELLS TRANSPLANTATION

Ya.P. Yastrebov, D.Yu. Grebnev, I.Yu. Maklakova

#### SUMMARY

In the following study there has been investigated the influence of combined transplantation both multipotent mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cells on the regeneration of myeloid tissue in the old laboratory animals after the ionizing radiation exposure. The following results are obtained: both under physiological and ionizing radiation conditions the combined transplantation of MMSC and HSC has a cyto protective action on the myeloid tissue due to reduction in cytogenetically changed cells, and thus leads to erythropoiesis and granulocytosis activation.

### ВІДНОВЛЕННЯ РЕГЕНЕРАЦІЇ МІЕЛОЇДНОЇ ТКАНИНИ СТАРИХ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ПІСЛЯ ПРОМЕНЕВОГО ПОШКОДЖЕННЯ НА ТЛІ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

А.П. Ястребов, Д.Ю. Гребнев, І.Ю. Маклакова

#### РЕЗЮМЕ

У дослідженні вивчався вплив поєднаної трансплантації мультипотентних мезенхімальних стромальних (ММСК) і гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) на регенерацію мієлоїдної тканини старих лабораторних тварин після впливу іонізуючого випромінювання. Отримано, що у старих лабораторних тварин у фізіологічних умовах і в умовах впливу іонізуючого випромінювання поєднана трансплантація ММСК і ГСК надає цитопротективне дію на мієлоїдну тканину за рахунок зменшення цитогенетически змінених клітин, призводить до активації еритропоезу і гранулоцитопоезу.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки, регенерация, миелоидная ткань, ионизирующее излучение.

По мере старения организма происходит снижение содержания стволовых клеток, за счет которых, главным образом, и восстанавливаются структура и функции поврежденного органа [2, 3]. Учитывая высокую чувствительность стволовых клеток костного мозга к ионизирующему излучению, актуальным является поиск факторов, способных увеличить их представительство в соответствующих нишах. При этом предпринимаются попытки воздействовать на систему гемопоэза с помощью клеточных биотехнологий [5, 6]. Проведенные ранее нами исследования выявили существенное влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на регенерацию миелоидной ткани костного мозга. Учитывая известные взаимоотношения между ММСК и гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) – способность ММСК вырабатывать хемоаттрактант для ГСК – SDF-1, представляло интерес изучение возможности активации регенерации миелоидной ткани после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток [1, 4].

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 48 белых лабораторных мышках-самцах возраста 3 года, массой 45-50 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены на 12 лабораторных животных мышках-самках возраста 3-4 месяца, массой 30 г, срок гестации 18 дней. Изучалось воздействие ионизирующего излучения (ИИ) дозой 4,0 Гр на лабораторных животных старшего возраста, были выделены опытная и контрольная подгруппы. Контрольную группу составили животные, не подвергшиеся облучению им вводили 0,9 % раствор NaCl – 0,4 мл внутривенно. Животным опытной подгруппы внутривенно вводилась суспензия ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. кл/кг и 300 тыс. кл./кг. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после облучения однократно. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения. Кровь для исследования брали у мышей из хвостовой вены. При определении числа ретикулоцитов их подсчитывали в окрашенных бриллиант – крезил – блау мазках крови на 2000 эритроцитов. Для

исследования морфологии костного мозга его извлекали из бедренной кости. Мазки костного мозга окрашивали по Нохту. Подсчет миелограммы производили на 500 клеток. Определяли общее количество миелокариоцитов в костном мозге бедренной кости. Производили оценку микроядерного теста (МЯТ).

МЯТ=Число полихроматофильных эритроцитов с микроядрами/1000 полихроматофильных эритроцитов x 100%.

Цитологические препараты костного мозга и периферической крови анализировались с помощью микроскопа Micros MC - 50 (Австрия) при увеличении 100\*15.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 1 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в физиологических условиях не выявлено существенных отличий изучаемых показателей между опытной подгруппой и контролем. В то же время на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при анализе

микроядерного теста отмечено уменьшение содержания полихроматофильных эритроцитов на 23,81 % относительно контрольной подгруппы (МЯТ:  $8,80 \pm 0,83$  %,  $p < 0,05$ ). Тем не менее, содержание цитогенетически измененных клеток было выше значения спонтанного уровня мутагенеза. При анализе миелограммы и данных периферической крови не выявлено существенных изменений изучаемых показателей в опытной подгруппе относительно контрольной подгруппы.

При анализе миелограммы на 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном диффероне установлено увеличение содержания базофильных и полихроматофильных нормобластов на 26,8 % и 37,04 % соответственно. Указанные изменения привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов в костном мозге на 35,6 % по сравнению с контролем. В то же время в гранулоцитарном диффероне не установлено существенного эффекта от сочетанной трансплантации клеток (Таблица 1).

Таблица 1

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости старых лабораторных мышей на 7 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. кл/бедро)	
		NaCl	Стволовые клетки
Миелокариоциты (общее число)		$9,42 \pm 0,68$	$9,57 \pm 0,61$
Нейтрофильные клетки	миелобласты	$0,12 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$
	промиелоциты	$0,09 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$
	миелоциты	$0,13 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$
	метамиелоциты	$0,29 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,04$
	палочкоядерные и сегментоядерные	$4,37 \pm 0,47$	$4,70 \pm 0,33$
Эозинофилы (всех генераций)		$0,13 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02$
Все гранулоцитарные элементы		$5,12 \pm 0,46$	$5,47 \pm 0,29$
Эритробласты		$0,04 \pm 0,013$	$0,06 \pm 0,01$
Нормобласты	базофильные	$0,27 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,03^*$
	полихроматофильные	$0,82 \pm 0,09$	$1,13 \pm 0,17^*$
	оксифильные	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,09$
Все эритроидные элементы		$1,15 \pm 0,10$	$1,56 \pm 0,19^*$
Лимфоциты		$2,72 \pm 0,22$	$2,68 \pm 0,25$
Прочие		$0,26 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,03$
Индекс созревания нейтрофилов		$0,14 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$
Индекс созревания эритронормобластов		$0,73 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,03$
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		$4,49 \pm 0,52$	$3,56 \pm 0,35$

Примечание: \* отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе микроядерного теста обнаружено уменьшение содержания полихроматофильных эритроцитов с микроядрами относительно контроля на 30,0 %. В то же время данные периферической крови существенно не отличались от значений контроля.

На 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном диффероне отмечено увеличение содержания эритробластов (+37,9 %), базофильных (+42,1 %), полихроматофильных нормобластов (+32,3 %) по сравнению с контрольной подгруппой. Указанные изменения привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов на 35,6 %. В гранулоцитарном диффероне обнаружено

восстановление содержания до значений нормы миелобластов и промиелоцитов. Также выявлено увеличение содержания миелоцитов, метамиелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов относительно контрольной подгруппы. Описанные изменения соответствовали восстановлению до значений нормы общего содержания гранулоцитарных элементов. Активация эритропоэза и гранулоцитопоэза привела к восстановлению общего содержания миелокариоцитов в бедренной кости до значений нормы. Обнаружено также увеличение содержания лимфоцитов на 23,7 % относительно контрольной подгруппы (Таблица 2).

Таблица 2

**Содержание клеток костного мозга в бедренной кости старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$**

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. кл/бедро)	
		NaCl	Стволовые клетки
Миелокариоциты (общее число)		6,28±0,72*	7,82±0,95
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,09±0,03	0,12±0,03
	промиелоциты	0,07±0,02	0,10±0,02
	миелоциты	0,09±0,02*	0,15±0,02**
	метамиелоциты	0,21±0,02*	0,26±0,02**
	палочкоядерные и сегментоядерные	3,18±0,38*	4,13±0,30**
Эозинофилы (всех генераций)		0,09±0,02*	0,11±0,02
Все гранулоцитарные элементы		3,74±0,39*	4,86±0,31**
Эритробласты		0,028±0,005	0,04±0,003**
Нормобласты	базофильные	0,19±0,04*	0,27±0,02**
	полихроматофильные	0,59±0,07*	0,78±0,04**
	оксифильные	0,01±0,006	0,02±0,01
Все эритроидные элементы		0,82±0,10*	1,11±0,06**
Лимфоциты		1,90±0,20*	2,35±0,35**
Прочие		0,19±0,03*	0,21±0,02
Индекс созревания нейтрофилов		0,15±0,03	0,15±0,01
Индекс созревания эритронормобластов		0,73±0,04	0,72±0,02
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		4,67±0,89	4,37±0,34

Примечание: \* отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ ; \*\* отличие от подгруппы старых интактных животных после воздействия ионизирующего излучения (контрольная подгруппа), достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе микроядерного теста отмечено, что уровень цитогенетически измененных клеток был на 38,52 % меньше, чем в контрольной подгруппе. При этом показатель МЯТ восстановился до значений нормы. При изучении данных периферической крови

выявлено увеличение содержания ретикулоцитов на 29,8 %, повышение общего содержания лейкоцитов на 20,6 %, гранулоцитов на 25,2 % и лимфоцитов на 20,7 % (Таблица 3).

Таблица 3

**Показатели периферической крови старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4 Гр,  $M \pm m$ , n = 9**

	Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
NaCl	85,50±10,50*	6,40±0,33*	1,72±0,36*	4,83±0,40*	0,20±0,02*
Стволовые клетки	111,00±9,33**	7,72±0,72**	2,15±0,23**	5,83±0,54**	0,20±0,04

Примечание: \* отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ ; \*\* отличие от подгруппы старых интактных животных после воздействия ИИ (контрольная подгруппа), достоверно с  $p < 0,05$ .

#### ВЫВОДЫ

1. У старых лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения сочетанная трансплантация ММСК и ГСК оказывает цитопротективное действие на миелоидную ткань за счет уменьшения цитогенетически измененных клеток.

2. В физиологических условиях сочетанная трансплантация ММСК и ГСК у старых лабораторных животных стимулирует эритропоэз, а после воздействия ионизирующего излучения приводит к активации эритропоэза и гранулоцитопоэза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сухих Г.Т. Мезенхимальные стволовые клетки / Г.Т. Сухих, В.В. Малайцев, И.М. Богданова,

Дубровина И.В.. Бюлл. Экспер. Биол и мед. 2002, 133, 2, 124-130.

2. Globerson A. Haematopoietic stem cell ageing. Novartis Found Symp. 2001;235:85-96; discussion 96-100, 101-4.

3. de Haan G. Hematopoietic stem cells: self-renewing or aging? Cells Tissues Organs. 2002;171(1):27-37.

4. Minguell J.J., Erices A., Conget P. "Mesenchymal stem cells". Exp. Biol. Med., 2001, 226(6), 507-520.

5. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. Mech Ageing Dev. 2001; 31;122(7):713-34.

6. Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M. Stem cells, hype and reality. // Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program). 2002. - pp. 369-391.