

УДК 612.683:616.343:614.875:612.014:616-092.4

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

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

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 ANALYSIS OF JEJUNUM EPITHELIUM REGENERATION IN THE OLD AND MATURE LABORATORY ANIMALS AFTER IONIZING RADIATION ON THE BACKGROUND OF STEM CELLS INSERTIONS

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

SUMMARY

This study was devoted to the investigation of influence of combined transplantation with hematopoietic stem cells and multipotent mesenchymal stromal cells on the jejunum epithelium regeneration in the old and mature laboratory animals under the physiological conditions and conditions of ionizing radiation. The following results are obtained: combined MMSC and HSC transplantation leads to the increase of cryptal epithelium in mature animals due to proliferate activity of epitheliocytes crypts, and apoptosis inhibition, alongside in old animals it leads to the same effect but due to decrease of programmed cell death of epitheliocytes.

АНАЛІЗ ВІДНОВЛЕННЯ РЕГЕНЕРАЦІЇ ЕПІТЕЛІЮ ТОНКОЇ КИШКИ СТАРИХ І ЗРІЛИХ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ПІСЛЯ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

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

РЕЗЮМЕ

У цьому дослідженні вивчався вплив поєднаної трансплантації гемопоетичних стовбурових і мультипотентних мезенхімальних стромальних на регенерацію клітин епітелію тонкої кишки зрілих і старих лабораторних тварин у фізіологічних умовах і в умовах впливу іонізуючого випромінювання. Отримано, що поєднана трансплантація ММСК і ДСК викликає збільшення кількості крипталного епітелію у зрілих лабораторних тварин за рахунок підвищення проліферативної активності епітеліоцитів крипти і інгібування апоптозу, тоді як у старих лабораторних тварин - за рахунок зниження запрограмованої клітинної загибелі епітеліоцитів.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гемопозитические стволовые клетки, регенерация, эпителий тощей кишки, ионизирующее излучение.

Известно, что воздействие ионизирующего излучения (ИИ) на организм приводит к повреждению быстрообновляющихся тканей, процессы регенерации в которых определяются количественным и качественным состоянием стволовых клеток. Восстановление пула стволовых клеток после воздействия ИИ с помощью проведения заместительной клеточной терапии может усилить регенерацию тканей [6, 7]. В последние годы получены данные о возможности слияния стволовых гемопоэтических клеток (ГСК) со стволовыми клетками кишечника, обеспечивающего активацию регенерации [4, 5]. Однако остаются неизученными механизмы усиления регенерации быстрообновляющихся тканей на фоне заместительной клеточной терапии в условиях старения организма [2]. В настоящем исследовании изучалось влияние сочетанной трансплантации гемопоэтических стволовых и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на регенерацию эпителия тощей кишки зрелых и старых

лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 54 белых лабораторных мышах-самцах возраста 3-4 месяцев, массой 25-30 г. и 54 белых лабораторных мышах-самцах возраста 3 года, массой 45-50 г [1, 3]. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены на 36 лабораторных животных мышах-самцах возраста 3-4 месяца, массой 25-30 г, срок гестации - 18 дней. Изучалось воздействие ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на лабораторных животных зрелого и старого возраста. Контрольную группу составили животные, не подвергшиеся облучению. Животным опытной подгруппы внутривенно вводилась суспензия ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. кл/кг и 300 тыс. кл./кг, контрольной подгруппе вводили 0,9% раствор NaCl - 0,4 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после облучения

однократно в указанных выше дозах. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения.

Оценивали пролиферативную активность кишечного эпителия с помощью определения митотического индекса (МИ) на гистологических срезах продольной ориентации. Подсчитывали эпителиоциты с четырьмя стадиями митоза, встречаемыми на 3000 – 3500 клеток, полученный результат выражали в процентах.

МИ = Количество митотически делящихся эпителиоцитов/3000 – 3500 подсчитанных эпителиоцитов крипт x 100%.

Оценивали уровень запрограммированной гибели эпителиоцитов с помощью определения апоптотического индекса (АИ) на гистологических срезах продольной ориентации. Подсчитывали эпителиоциты с картиной апоптоза, встречаемые на 3000 клеток, полученный результат выражали в процентах.

АИ = Количество эпителиоцитов в состоянии апоптоза/3000 подсчитанных эпителиоцитов x 100%

Среднюю клеточность в одной крипте определяли, как отношение общего числа подсчитанных криптальных клеток к количеству анализированных крипт, выраженное в процентах.

Гистологические препараты тощей кишки анализировались с помощью микроскопа Micros MC – 50 (Австрия) при увеличении 100*15.

Количественная оценка апоптоза осуществлялась при флуоресцентной микроскопии с использованием двух флуорохромов: акридин оранжевым (производство Финляндия) и Annexin V – FITC fluorescence microscopy (производство США).

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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные морфометрические исследования препаратов слизистой оболочки кишечника на 1 сутки после трансплантации стволовых клеток показали отсутствие значимых изменений в пролиферативной активности криптального эпителия, выраженности запрограммированной клеточной гибели, а также в содержании криптального эпителия зрелых и старых лабораторных животных (таблица 1).

Таблица 1

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки, $M \pm m$, $n = 9$

Параметры	Значение			
	NaCl		Стволовые клетки	
	Зрелые	Старые	Зрелые	Старые
Митотический индекс, %	2,27±0,18	1,55±0,22	2,27±0,20	1,45±0,22
Апоптотический индекс, %	1,45±0,18	1,70±0,33	1,48±0,12	1,65±0,33
Средняя клеточность 1 крипты	40,40±4,10	27,78±2,08	41,38±3,88	28,95±3,33

При проведении морфометрического исследования на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения на фоне введения стволовых клеток у зрелых лабораторных животных не выявлено значимых отличий изучаемых показателей относительно контрольной подгруппы. В то же время у старых лабораторных животных отмечено угнетение запрограммированной клеточной гибели на 21,67 %. Несмотря на антиапоптогенное действие сочетанной трансплантации ММСК и ГСК общее содержание клеток криптального эпителия не отличалось от показателя в контрольной подгруппе, и было ниже значений нормы (таблица 2).

На 7 сутки после введения стволовых клеток в физиологических условиях в тощей кишке зрелых и старых лабораторных животных установлено повышение содержания криптального эпителия на 27,8 % и 38,9 % соответственно относительно контрольных групп. У зрелых лабораторных

животных это произошло за счет активации пролиферации клеток (МИ: 3,03±0,57, $p < 0,05$), тогда как у старых – за счет угнетения апоптоза (АИ: 1,25±0,15 %, $p < 0,05$) (таблица 3).

На 7 сутки после воздействия экстремального фактора у зрелых лабораторных животных установлен пролиферативный ответ криптального эпителия на сочетанную трансплантацию клеток – увеличение митотического индекса на 32,0 % по сравнению с контрольной подгруппой (МИ: 3,14±0,44 %, $p < 0,05$). При подсчете клеток в состоянии апоптоза выявлено, что содержание таких клеток восстановилось до значений нормы, и на 46,7 % было меньше, чем в контроле. Указанные изменения соответствовали восстановлению содержания криптального эпителия до значений нормы. У старых лабораторных животных выявлено восстановление пролиферативной активности эпителиоцитов крипт до значений нормы. При подсчете клеток в состоянии апоптоза установлено снижение уровня

Таблица 2

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр, $M \pm m$, $n = 9$

Параметры	Значение			
	NaCl		Стволовые клетки	
	Зрелые	Старые	Зрелые	Старые
Митотический индекс, %	1,44±0,15*	0,88±0,15°	1,41±0,16*	0,93±0,13°
Апоптотический индекс, %	4,01±0,23*	4,38±0,52°	4,07±0,30*	3,43±0,32° ⁰⁰
Средняя клеточность 1 крипты	20,56±1,17*	17,93±1,37°	19,67±1,17*	17,62±2,08°

Примечание: * отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с $p < 0,05$; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с $p < 0,05$; ⁰⁰ отличие от подгруппы старых животных после воздействия ИИ (контрольная подгруппа), достоверно с $p < 0,05$.

Таблица 3

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки, $M \pm m$, $n = 9$

Параметры	Значение			
	NaCl		Стволовые клетки	
	Зрелые	Старые	Зрелые	Старые
Митотический индекс, %	2,20±0,20	1,72±0,22	3,03±0,57*	1,62±0,26
Апоптотический индекс, %	1,48±0,15	1,62±0,25	1,42±0,09	1,25±0,15°
Средняя клеточность 1 крипты	41,58±3,88	25,68±2,49	53,13±7,56*	35,57±3,04°

Примечание: * отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с $p < 0,05$; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с $p < 0,05$.

запрограммированной клеточной гибели на 50,5 % по сравнению с контролем. Также произошло восстановление содержания эпителиоцитов крипт до

значений нормы. Данный показатель был на 38,5 % больше, чем в контрольной подгруппе (таблица 4).

Таблица 4

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр, $M \pm m$, $n = 9$

Параметры	Значение			
	NaCl		Стволовые клетки	
	Зрелые	Старые	Зрелые	Старые
Митотический индекс, %	2,50±0,58	1,55±0,18	3,30±0,53**	1,73±0,34
Апоптотический индекс, %	3,43±0,45*	3,47±0,37°	1,83±0,46**	1,72±0,28**
Средняя клеточность 1 крипты	27,34±2,43*	21,02±1,18	34,69±2,48**	27,50±1,77**

Примечание: * отличие от группы интактных животных (контрольная группа), достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от подгруппы интактных животных после воздействия ИИ (контрольная подгруппа), достоверно с $p < 0,05$; ° отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с $p < 0,05$; ⁰⁰ отличие от подгруппы старых интактных животных после воздействия ИИ (контрольная подгруппа), достоверно с $p < 0,05$.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в физиологических условиях сочетанная трансплантация ММСК и ГСК вызывает увеличение количества криптального эпителия. У зрелых лабораторных животных это происходит за счет повышения пролиферативной активности эпителиоцитов крипт, тогда как у старых – за счет угнетения апоптоза. В условиях воздействия ионизирующего излучения сочетанная трансплантация ММСК и ГСК вызывает увеличение количества криптального эпителия у зрелых

лабораторных животных за счет повышения пролиферативной активности эпителиоцитов крипт и ингибирования апоптоза, тогда как у старых лабораторных животных оказывая антиапоптогенное действие на эпителиоциты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К.М. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови / К.М. Абдулкадыров, Н.А. Романенко, Н.Н. Старков // Вопросы онкологии 2000. - 46(5). - С 513–20.

2. Анисимов В. Н. Современные представления о природе старения // Успехи соврем, биол. 2000. Т. 120, С. 146-164.
3. Шахпазян Н.К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н.К. Шахпазян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева . КТТИ 2012 Март; VII(1): 23-33
4. Brittan M., Hunt T., Jeffery R. et al. Bone marrow derivation of pericyptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut*. 2002; 50: 752-7.
5. Matsumoto T., Okamoto R., Yajima et al. Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. *Gastroenterology* 2005; 128: 1851-67.
6. Ogle B.M., Cascalho M., Platt J.L. Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol Cell Biol*. 2005; 6 (7): 567-75.
7. Peters B.A., Diaz L.A., Polyak K. et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat. Med*. 2005; 1:261-2.