

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

Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», 620000, г.Екатеринбург, ул. Репина, д. 3
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», 620000, г.Екатеринбург, ул. Соболева, д. 21

В данном исследовании изучался хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях воздействия экстремальных факторов: после лучевой нагрузки, острой кровопотери. Поглощенная доза ионизирующего излучения составила 4,0 Гр (вызывает острую лучевую болезнь у мышей), острая кровопотеря была вызвана кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2% от массы тела животного. Для метки ММСК использовали флуорохром DAPI, готовый к использованию. Эксперименты выполнены на 60 зрелых лабораторных мышках-самцах возраста 6–8 месяцев, массой 20–25 г. Эксперименты по получению культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из плаценты (хорион) выполнены на лабораторных мышках-самках в возрасте 3–4 месяцев при сроке гестации 14 сут. Введение суспензии ММСК осуществлялось в дозе 6 млн клеток/мышь, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Контрольной группе лабораторных животных трансплантация ММСК проводилась также в количестве 6 млн клеток/мышь. Производилась оценка тканевого химеризма в периферической крови, костном мозге, селезенке, тонком кишечнике, печени, легких, почках, сердце через 1 и 24 ч после трансплантации меченых клеток. Было установлено существенное снижение содержания меченых ММСК в периферической крови при экстремальном воздействии, что свидетельствует о миграции трансплантированных клеток в поврежденные ткани. При этом хоуминг трансплантированных ММСК реализуется преимущественно в те ткани, которые подверглись наибольшему повреждению.

Ключевые слова: хоуминг, трансплантация, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, экстремальные факторы.

Для цитирования: Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 82-86.

Maklakova I.Yu., Grebnev Y.D., Yastrebov A.P.

The influence of extreme factors on homing multipotent mesenchymal stromal cells

«Ural state medical University», Department of pathological physiology, 620000, Ekaterinburg, Repin street, 3
«Institute of medical cell technologies», 620000, Ekaterinburg, Soboleva str., 21

In this study, we studied homing multipotent mesenchymal stromal cells under influence of extreme factors: after radiation exposure, acute blood loss. Absorbed dose ionizing radiation amounted to 4.0 G (causes acute radiation sickness in mice), acute blood loss was caused by bleeding from the tail vein of the mouse in the amount of 2% of the body weight of the animal. Label MMSC used fluorochrome DAPI, ready to use. The experiments were performed on 60 Mature mice (males) age 6–8 months, weighing 20–25 g. Experiments on the culture of multipotent mesenchymal stromal cells from the placenta (chorion) performed on laboratory mice female at the age of 3–4 months in the gestation period of 14 days. Introduction suspensions of MMSC was carried out at a dose of 6 million cells/mouse, suspended in 0.2 ml 0.9% NaCl solution. The control group of laboratory animals MMSC transplantation was carried out also in the amount of 6 million cells/mouse. The assessment was made of tissue chimerism in the peripheral blood, bone marrow, spleen, small intestine, liver, lung, kidney, heart after 1 and 24 hours after transplantation of labeled cells. It was found a significant decrease in the content of labeled MMSC in the peripheral blood at extreme impact, indicating a migration of the transplanted cells in the damaged tissue. Homing transplanted MMSC is realized mainly in those tissues that underwent the most damage.

Key words: homing, transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells, extreme factors.

For citation: Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 82-86

For correspondence: Grebnev Y.D., e-mail: dr-grebnev77@mail.ru

Проблема клеточного восстановления после воздействия повреждающего фактора продолжает оставаться актуальным вопросом современной биологии и медицины. Известно, что активация компенсаторно-приспособительных механизмов после воздействия экстремальных факторов на организм может приводить к восстановлению специфических функций, выполняемых данной тканью [1, 2]. Одна из основных целей регенеративной медицины — понять механизмы, по которым трансплантация клеток с высоким регенераторным потенциалом приводит к регенерации поврежденных тканей [3, 4]. Эти механизмы реализуются на основе хоуминга, пластичности трансплантированных клеток, слияния с клетками реципиента, паракринными механизмами, через формирование межклеточных контактов [5, 6]. Известно, что поврежденные ткани способны индуцировать выработку хемоаттрактанта для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) — stromal derived factor (SDF-1) [7—9]. Различная степень выраженности хоуминга ММСК может оказывать существенное влияние на восстановление регенерации тканей через выработку цитопротективных (белков теплового шока), противовоспалительных факторов (TGF- β , ИЛ-10) [10].

Вышеизложенное позволило сформулировать *цель настоящего исследования* — изучить хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях воздействия экстремальных факторов: после лучевой нагрузки, острой кровопотери.

Методика

Эксперименты выполнены на 60 зрелых лабораторных мышках-самцах возраста 6—8 мес., массой 20—25 г. Эксперименты по получению культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из плаценты (хорион) выполнены на лабораторных мышках-самцах в возрасте 3—4 мес. при сроке гестации 14 дней.

Культура ММСК

Получение клеточной культуры ММСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. При этом мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной (раствор акутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты. С целью получения первичной культуры ММСК осуществлялся пассаж мононуклеарной фракции клеток, выделенной из ткани плаценты, в специализированной среде для культивирования ММСК в чашки Петри в концентрации 1×10^6 клеток на 1 см^2 . Культивирование ММСК проводилось в условиях CO_2 -инкубатора

при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Через 24—48 часов инкубации не прикрепленные к дну чашки Петри клетки аспирировали [11]. Среда для культивирования ММСК добавляли к прикрепленным к пластике клеткам. Замена среды проводилась каждые 3—4 сут. до достижения клетками 70—80% конfluence. При формировании соответствующего монослоя осуществлялся пересев клеток.

Состав специализированной среды для культивирования ММСК:

MesenCult MSC Basal Medium Mouse и MesenCult™ Proliferation Supplements Mouse в соотношении 4:1. Также в состав данной среды входило 2 ммоль раствора L-глутамин и антибиотики — пенициллин 50 ед./мл и стрептомицин 50 мкг/мл.

Идентификация ММСК

Дифференцировка в остеогенном направлении

Дифференцировка ММСК в остеогенном направлении включала следующую последовательность действий:

ММСК третьего пассажа были высеваны в 6-камерные планшеты (площадь лунки $9,6 \text{ см}^2$; «Nunc», Германия) в концентрации $1,0 \times 10^5$ клеток на лунку в специализированную среду для культивирования ММСК (состав указан выше).

1. Культивирование продолжалось до достижения 70—80% конfluence.

2. Аспирация специализированной среды для культивирования ММСК и замена ее на раствор, индуцирующий дифференцировку ММСК в остеогенном направлении.

Приготовление раствора, индуцирующего дифференцировку ММСК в остеогенном направлении: 10 мл среды, содержащей стимуляторы остеогенной дифференцировки — MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement добавляли к 40 мл основного раствора — MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse). К полученному раствору также было добавлено 0,5 мл (200 ммоль) раствора L-глутамин. Таким образом, конечная концентрация L-глутамин составляла 2 ммоль.

3. Культивирование продолжалось в течение 2 недель с заменой среды каждые трое суток.

Факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция.

Окраска на щелочную фосфатазу

Клетки трехкратно промывали 1xPBS и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали PBS три раза по

5 мин, после чего окрашивали на щелочную фосфатазу смесью BCIP-NBT (5-бром-4-хлор-индолил фосфат, тетразолевый синий) (Sigma, США) в течение 20—40 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные препараты 3—4 раза промывали дистиллированной водой и высушивали.

Реакция von Kossa

ММСК фиксировали в метаноле 2 мин при температуре 20°C. В течение 1 ч проводили окраску 2%-ным раствором нитрата серебра (AgNO_3) (Вектон, Россия) под 60W лампой. Окрашенные клетки быстро промывали дистиллированной водой и на 5 мин помещали в 2,5%-ный раствор тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Окрашенные клетки повторно промывали дистиллированной водой и высушивали. Данная окраска позволяет выявлять нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве.

Дифференцировка в адипоцитарном направлении

Дифференцировка ММСК в адипоцитарном направлении включала следующую последовательность действий:

1. ММСК третьего пассажа были высеяны в 6-камерные планшеты («Nunc», Германия) в концентрации $1 \cdot 10^5$ клеток на лунку в специализированную среду для культивирования ММСК (состав указан выше).

2. Культивирование продолжалось до достижения 70—80% конfluence.

3. Аспирация специализированной среды для культивирования ММСК и замена ее на раствор, индуцирующий дифференцировку ММСК в адипоцитарном направлении.

Приготовление раствора, индуцирующего дифференцировку ММСК в адипоцитарном направлении: 10 мл среды, содержащей стимуляторы адипоцитарной дифференцировки — MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement добавляли к 40 мл основного раствора — MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse). К полученному раствору также было добавлено 0,5 мл 200 ммоль раствора L-глутамин. Таким образом, конечная концентрация L-глутамин составляла 2 ммоль.

4. Культивирование продолжалось в течение 2 недель с заменой среды каждые трое суток.

Факт адипоцитарной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации нейтральных липидных вакуолей, окрашивающихся красителем Oil Red O («Sigma», США).

Окраска жирным красным (Oil Red O)

1. Рабочий раствор Oil Red O приготовлен следующим образом: используя изопропанол был получен 0,5% раствор Oil Red O (Sigma, США) с последу-

ющим добавлением дистиллированной воды в соотношении 3:2.

2. Полученный раствор был профильтрован через фильтры 0,2 мкм.

3. Культура клеток была фиксирована в метаноле в течение 2 минут.

4. Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали раствором жирного красного в течение 10 мин.

5. Окрашенные клетки промывали 50%-ным этанолом.

Культуры клеток исследовали на инвертированном микроскопе (UNICO, США) с использованием цифровой фотокамеры Cam V400 (Vision, Австрия).

Иммуноцитохимия

Для подтверждения принадлежности культуры к ММСК производилась окраска клеток с помощью набора антител Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США), содержащего позитивные (анти-тела к integrin $\beta 1$, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (анти-тела к CD 14, CD 45).

Производилась дифференцировка полученной культуры в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Состав среды, индуцирующей дифференцировку: MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement / MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement и MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) в соотношении 1:4, 2 ммоль раствора L-глутамин. Факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция. Способность клеток дифференцироваться в адипоцитарном направлении подтверждена гистохимическим методом регистрации липидных вакуолей, окрашивающихся красителем Oil Red O.

Подсчет и определение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего. Подсчет клеток производился в 5 больших квадратах камеры Горяева (или ≥ 100 клеток). Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95—97%.

В тех случаях, где не указан производитель химических реактивов были использованы реактивы фирмы StemCell Technologies (Канада).

Для метки ММСК использовали раствор DAPI (Millipore, США), готовый к использованию.

Экстремальные воздействия

Облучение животных проводилось на гамма-терапевтической установке типа АГАТ-С с радионуклид-

ным источником Co-60, поглощенная доза составила 4,0 Гр, мощность поглощенной дозы 20 сГр/мин. Острая кровопотеря была вызвана кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2% от массы тела животного.

При трансплантации лабораторным животным была использована культура ММСК третьего пассажа.

Внутриривенная трансплантация проводилась через 1 час после моделирования экстремального фактора. Введение суспензии ММСК осуществлялось в дозе 6 млн клеток/мышь, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Контрольной группе лабораторных животных трансплантация ММСК проводилась также в количестве 6 млн клеток/мышь. Количество экспериментальных животных, использованных в отдельных сериях исследований, представлено в табл. 1.

Статистический анализ

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Достоверность различий в сравниваемых выборках проведена по критерию Манна—Уитни (U) [4]. В некоторых случаях для вычисления статистической значимости полученных результатов использовался критерий χ^2 . Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Вероятность различий считалась достоверной при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В физиологических условиях через 1 час после трансплантации меченые DAPI ММСК были обнаружены в периферической крови, костном мозге, селезенке, тонком кишечнике, печени и почках (табл. 2). В то же время в легких и сердце не выявлены меченые ММСК.

После воздействия ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр на фоне трансплантации ММСК выявлен существенно значимый тканевой химеризм в костном мозге, селезенке и тонком кишечнике. Так, установлено, что в костном мозге содержание трансплантированных ММСК было в 4,34 ($p < 0,05$), в селезенке в 6,21 ($p < 0,05$), в тонком кишечнике в 3,21 ($p < 0,05$) раза больше, чем в контрольной группе.

После острой кровопотери на фоне аллогенной трансплантации ММСК выявлено преимущественное содержание введенных ММСК в костном мозге и селезенке.

В условиях воздействия экстремальных факторов в периферической крови, легких и сердце меченых DAPI ММСК не обнаружено.

В физиологических условиях через 24 часа после трансплантации меченых DAPI ММСК установлено существенное повышение введенных клеток в костном мозге (+51,2%, $p < 0,05$) (табл. 3). При этом в периферической крови, легких и сердце введенные ММСК обнаружены не были. После лучевой нагрузки и острой кровопотери показатели тканевого химеризма в изучаемых органах и тканях существенно не отличались от данных контроля.

Количество экспериментальных животных, использованных в отдельных сериях исследований

	Путь введения	Количество ММСК	Количество животных
Контроль	в/в	6 млн клеток/мышь	20 шт.
Острая кровопотеря	в/в	6 млн клеток/мышь	20 шт.
Ионизирующее излучение 4,0 Гр	в/в	6 млн клеток/мышь	20 шт.

Таблица 1

Распределение меченых DAPI ММСК в органах и тканях лабораторных животных через 1 час после трансплантации, $M \pm m$, $n = 10$

	Содержание трансплантированных ММСК* 10^3 , %		
	Физиологические условия	Ионизирующее излучение, 4,0 Гр	Острая кровопотеря
Кровь	19,13 \pm 3,62	Нет	Нет
Костный мозг	0,41 \pm 0,07	1,78 \pm 0,34*	1,56 \pm 0,18*
Селезенка	0,38 \pm 0,05	2,36 \pm 0,82*	1,14 \pm 0,21*
Тонкий кишечник	0,19 \pm 0,06	0,61 \pm 0,07*	0,24 \pm 0,04
Печень	0,33 \pm 0,07	0,38 \pm 0,02	0,32 \pm 0,05
Почки	0,73 \pm 0,14	0,64 \pm 0,18	0,97 \pm 0,08
Легкие	Нет	Нет	Нет
Сердце	Нет	Нет	Нет

Таблица 2

Примечание. * — отличие от группы контрольных животных, достоверно с $p < 0,05$

Распределение меченных DAPI ММСК в органах и тканях лабораторных животных через 24 часа после трансплантации, $M \pm m, n = 10$

Органы и ткани	Содержание трансплантированных ММСК* $10^3, \%$		
	Физиологические условия	Ионизирующее излучение, 4,0 Гр	Острая кровопотеря
Кровь	Нет	Нет	Нет
Костный мозг	$0,62 \pm 0,09^*$	$1,55 \pm 0,47$	$1,31 \pm 0,15$
Селезенка	$0,56 \pm 0,04$	$1,8 \pm 0,6$	$1,46 \pm 0,28$
Тонкий кишечник	$0,34 \pm 0,08$	$0,7 \pm 0,09$	$0,11 \pm 0,03$
Печень	$0,42 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,08$
Почки	$0,85 \pm 0,06$	$0,69 \pm 0,56$	$0,72 \pm 0,12$
Легкие	Нет	Нет	Нет
Сердце	Нет	Нет	Нет

Примечание. * — отличие от группы контрольных животных, достоверно с $p < 0,05$

Таким образом, можно предположить, что резкое снижение содержания меченых ММСК в периферической крови при экстремальном воздействии отражает быстрый их выход в поврежденные ткани. При этом хоуминг трансплантированных ММСК реализуется преимущественно в те ткани, которые подверглись наибольшему повреждению.

References

1. Alchinova I.B., Arhipova E.N., Medvedeva Ju.S., Cherepov A.B., Karganov M.Ju. Dinamika izmenenija fiziologicheskikh pokazatelej myshey s razlichnoj radiochuvstvitelnost'ju posle ostrogo gamma-obluchenija. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2014; 157(2): 150-4. (in Russian)
2. Grebnev D.Ju. *Vlijanie citoprotektivnoj terapii tizolem na processy regeneracii mieloidnoj tkani i jepitelija toshhej kishki pri vozdeystvii ionizirujushhego izluchenija*: dis. na soiskanie uchenoj stepeni kandidata medicinskih nauk: 14.00.16 / Grebnev Dmitrij Jur'evich. — GOUVPO «Ural'skaja gosudarstvennaja medicinskaja akademija» Ekaterinburg, 2006; 208 s. (in Russian)
3. Maklakova I.Ju. *Vlijanie mul'tipotentnyh mezenhimal'nyh stromal'nyh kletok, vydelennyh iz placenty, na regeneraciju bystroobnovljajushhihsja tkanej zrelyh i staryh laboratornyh zhivotnyh pri vozdeystvii jekstremal'nyh faktorov*: dis. na soiskanie uchenoj stepeni kandidata medicinskih nauk. GOUVPO «Ural'skaja gosudarstvennaja medicinskaja akademija», Ekaterinburg, 2010. (in Russian)
4. Jastrebov A.P., Grebnev D.Ju., Maklakova I.Ju. Jeksperimental'noe obosnovanie ispol'zovanija sochetannoj transplantacii stvolovyh kletok dlja korrekcii regeneracii bystroobnovljajushhihsja tkanej posle lucheвого povrezhdenija. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki*. 2012 2(39): 141. (in Russian)
5. Poveshhenko A.F., Poveshhenko O.V., Konenkov V.I. Sovremennye dostizhenija v sozdanii metodov izuchenija migracii stvolovyh kletok. *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk*. 2013; 9: 46-52. (in Russian)
6. Minguell J.J., Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Experimentalnaya biologiya i meditsina*. 2006; 231(1): 39-49. (in Russian)
7. Maklakova I.Ju., Grebnev D.Ju., Jastrebov A.P. *Sposob vosstanovlenija mieloidnoj tkani staryh laboratornyh zhivotnyh posle vozdeystvija ionizirujushhego izluchenija*. № 2008152842/14, zjavl. 30.12.2008; opubl. 20.07.2010 // Izobretenija. Poleznye modeli. 2010. Bjul. № 20 (III ch.). S 790. (in Russian)
8. Grebnev D.Ju. Perspektiva primenenija sochetannoj transplantacii stvolovyh kletok dlja vosstanovlenija gemopozjeza. *Vestnik Ural'skoj meditsinskoj akademicheskoy nauki*. 2012; 3 (40): 67-8. (in Russian)
9. Lange C., Brunswig-Spickenheier B., Cappallo-Obermann H. et al. Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. *PLoS ONE*. 2011; 6: e14486.
10. Glanc S.A. *Mediko-biologicheskaja statistika*. M.: Praktika, 1999; 459 s. (in Russian)
11. Ahn JY, Park G, Shim JS, et al. Intramarrow injection of beta-catenin-activated, but not naive mesenchymal stromal cells stimulates self-renewal of hematopoietic stem cells in bone marrow. *Exp Mol Med*. 2010; 42: 122-31.

Поступила 07.08.15

Сведения об авторах:

Маклакова Ирина Юрьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», ассистент каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России

Ястребов Анатолий Петрович, доктор мед. наук, проф., ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России