

Совместная трансплантация мезенхимальных и гематopoэтических стволовых клеток для восстановления гемопоэза у мышей, нарушенного вследствие воздействия ионизирующей радиации

Павлова Л.Н., Жаворонков Л.П., Павлов В.В.,
Чибиcова О.Ф., Иванов В.Л., Панфилова В.В.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф.Цыба – филиал
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск

В последние годы в экспериментальных и клинических исследованиях для более полноценного и быстрого восстановления кроветворения после интенсивной цитостатической химио- и лучевой терапии злокачественных опухолей предпринимаются попытки сочетанного использования стволовых кроветворных клеток (СКК) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК). В работах последних лет убедительно продемонстрирована важная роль стромальной поддержки в реконструкции кроветворения [2, 5, 7, 8, 9]. МСК, являясь мультипотентными стволовыми клетками, способны дифференцироваться в различные типы мезенхимальной природы и обеспечивать микроокружение, необходимое для поддержки кроветворения [4]. Результаты экспериментальных исследований позволяют пересмотреть взгляд на возможности трансплантации СКК и открывают перспективы для использования МСК в качестве основы создания благоприятных условий для приживания и жизнеспособности трансплантата. При этом мезенхимальным стволовым клеткам отводится роль построения специальных «ниш» для стволовых кроветворных клеток, формирования новых сосудов и улучшения микроциркуляции [1, 6, 11], что в ряде работ подтверждается результатами морфологических исследований с применением меченых мезенхимальных стволовых клеток (1, 2). Кроме того, МСК вырабатывают SDF-1 (Stroma-derived-factor-1) – хемотаксический фактор, играющий ключевую роль в реализации «хоуминговых» путей миграции трансплантированных СКК [3, 10]. Можно предположить, что развивающийся при различных гематобластозах и углубляющийся после лучевой и химио- терапии дефицит этого фактора может быть ликвидирован или минимизирован путем котрансплантации гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток. В настоящее время результаты таких исследований немногочисленны и противоречивы. Сравнительной же оценки влияния различных режимов котрансплантации МСК и СКК в зависимости от их дозовых и временных соотношений на восстановление кроветворения до сих пор не проводилось. Проведенными нами ранее исследованиями на мышах показано, что сочетанное применение МСК и СКК при их внутривенном введении ускоряет восстановление кроветворения после цитостатической аплазии, вызванной сублетальной дозой циклофосфана (500 мг/кг). При этом наилучший эффект выявлен при алгоритме сочетания МСК→СКК с интервалом между введениями в пределах 24-48 часов.

Цель настоящего исследования – провести сравнительный анализ эффективности испытанных ранее режимов котрансплантации МСК и СКК для восстановления кроветворения при костномозговой форме острой лучевой болезни.

Материалы и методы исследования.

Опыты поставлены на 65 линейных мышах F_1 (СВА х $C_{57}BL_6$) самках, массой 20-22 г. Животных облучали направленным сверху пучком электронов с помощью стационарной установки «Novac» в дозе 8,2 Гр, МД -10 МэВ (экспозиция 2 мин 36 с). Облучение производили в пластиковых контейнерах, высотой 3 см, диаметром 10 см. Пространство позволяло облучать одновременно по 3 животных, которые во время сеанса полностью его заполняли и в то же время могли перемещаться.

Предварительно поставленными экспериментами на 50 мышах была произведена сравнительная оценка степени острой лучевой болезни, вызванной электронным потоком установки «Novac» при выше описанных условиях облучения и γ -облучением в дозе 8 Гр на установке «Луч-2». Контролем в обоих случаях служили интактные мыши, подвергнутые ложному облучению. Лучевую болезнь оценивали по клинической картине и выживаемости в течение 30 суток, а степень аплазии – по показателям системы крови через 5 суток после лучевого воздействия. Показано, что облучение электронами в данной постановке опыта вызывает костномозговую форму острой лучевой болезни, аналогичную по степени проявления после γ -облучения в той же дозе. К 5-ти суточному сроку после облучения в обеих группах выявлялась одинаковая потеря массы тела (в среднем 2,5 г), а к 14 суткам погибло по 50% мышей. Показатели системы крови через 5 суток после облучения электронами свидетельствуют о резко выраженном угнетении кроветворения по показателям периферической крови и клеточности костного мозга. Так, число лейкоцитов, тромбоцитов и миелокариоцитов уменьшилось вдвое по сравнению с биологическим контролем, а ретикулоциты в большинстве проб вообще не обнаруживались. Это исследование позволило нам дозу облучения электронами, близкую к 8 Гр, считать приемлемой для изучения влияния котрансплантации стволовых клеток на реконструкцию костномозгового кроветворения, нарушенного вследствие тотального лучевого воздействия в сублетальных дозах.

С этой целью проведено исследование на 65 животных, разделенных по массе тела на 5 равноценных групп (табл. 1). Группа 1 служила биологическим контролем (интактные). Мыши 4-х подопытных групп подвергались облучению электронами. Одна из этих групп (гр.2) служила облученным контролем для остальных подопытных, получавших стволовые клетки. В зависимости от режима сочетания МСК и СКК и продолжительности периода от облучения до введения стволовых клеток сформировано 3 группы:

- введение МСК и СКК одновременно (гр.3);
- предварительное введение МСК, а затем СКК с интервалом 24 часа (гр.4);

Лечение в группах 2, 3 и 4 начинали на вторые сутки после облучения (через 24-26 часов). Мышам группы 5

стволовые клетки вводили по схеме группы 4, но начинали лечение на 1 сутки раньше, то есть сразу после облучения. Животные контрольной облученной группы (гр.1) в дни введения стволовых клеток мышам подопытных групп получали такое же по объему количество физиологического раствора внутривенно.

Стволовые клетки вводили в хвостовую вену в объеме 0,2 мл. Животные контрольной облученной группы (гр.1) в дни введения стволовых клеток мышам подопытных групп получали такой же объем физиологического раствора внутривенно. Во всех случаях инвазивных вмешательств строго соблюдались условия стерильности. Стволовые кроветворные клетки (СКК) получали ex tempore из костного мозга бедра мыши той же линии из одной поставки животных и вводили в количестве 130-150 тысяч клеток на мышшь. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) получали из банка клеток лаборатории экспериментальной и клеточной лучевой терапии МРНЦ и вводили внутривенно по 200 тысяч клеток.

Таблица 1. Показатели массы тела и системы крови у линейных мышей через 8 суток после облучения электронами в дозе 8,2 Гр и лечения мезенхимальными и кроветворными стволовыми клетками (МСК и СКК) при разных схемах их сочетания, (M±m).

Группы	Гематологические показатели							Масса животных, г
	Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Ретикулоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Кариоциты, $\times 10^6$ на бедро	Селезёнка			
					Масса, мг	Общая клеточность, $\times 10^6$	Клеток / 100 мг ткани, $\times 10^6$	
1. Биологич. контроль (интактные)	7,81±0,62	912,1±70,2	47,1±8,0	21,0±0,9	87,8±4,6	175,2±8,2	200,4±6,3	21,0±0,3
Подопытные с облучением								
2. Облучение (Контроль)	1,13±0,09	181,4±15,3	10,1±4,2	1,40±0,13	31,4±3,1	12,0±1,0	39,9±4,2	17,9±0,9
3. МСК+СКК ¹ (одновременно)	1,56±0,21	171,4±26,4	20,7±3,5^u	1,44±0,13	40,4±3,7	27,2±5,9*	63,7±8,5*	18,1±1,0
4. МСК→СКК ¹ (интервал 24 ч.)	1,74±0,25*	122,5±9,4** ↓	13,7±1,8	1,54±0,10	32,4±2,7	19,4±1,6**	61,8±6,0*	19,8±0,8⁺
5. МСК→СКК ⁰ (интервал 24 ч.)	1,98±0,27*	174,4±16,1	51,1±10,2**	1,73±0,18	37,4±3,7	30,8±4,8**	78,2±8,0**	18,0±0,7

Примечание: ¹ – лечение начинали через 1 сутки после облучения; ⁰ – через 1-2 часа после облучения; **, * - значимые ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,5$) различия показателей с группой облученного контроля по t-критерию Стьюдента, ^{u, +} - по критериям Вилкоксона-Манна-Уитни и Кси-квадрат, соответственно ($p \leq 0,05$). В группах по 9 животных

К 7-8 суткам внешние различия почти исчезали, однако, по массе тела облученные животные всех групп за исключением 4-ой (МСК→СКК с интервалом 24 часа) на 2-3 г отставали от группы биологического контроля (табл.1). Анализ результатов показателей периферической крови и общей клеточности кроветворных органов (костного мозга и селезёнки) через 8 суток после радиационного воздействия электронным потоком в дозе 8,2 Гр показал, что у мышей всех экспериментальных групп, как с лечением стволовыми клетками, так и без него, наблюдалась глубокая степень аплазии костномозгового кроветворения. Однако следует отметить, что в группах мышей, пролеченных стволовыми клетками, показатели периферической крови (рети-

кулоциты и лейкоциты) несколько выше, чем в группе облученного контроля. Это проявляется в виде тенденции или даже статистической значимости. Так, число ретикулоцитов в периферической крови мышей группы 5, которых начинали лечить сразу после облучения по схеме МСК→СКК с интервалом 24 часа, превышало в 5 раз этот показатель у мышей облученного контроля и соответствовало показателю интактных животных. Следует отметить также большую сохранность показателей системы крови в этой группе по сравнению с показателями группы 4, получавшей стволовые клетки не сразу после облучения, а спустя 1 сутки. При отсутствии значимого положительного эффекта по общей клеточности костного мозга выявля-

Результаты

На протяжении 8 суток после облучения отмечались некоторые различия по внешнему виду и общему статусу мышей всех подопытных групп по сравнению с интактными животными (биологическим контролем). Начиная с 4-х суток у большей части животных из группы наблюдалась адинамия, взъерошенность, в единичных случаях искривленность позвоночника (сгорбленность), уменьшалась масса тела.

кулоциты и лейкоциты) несколько выше, чем в группе облученного контроля. Это проявляется в виде тенденции или даже статистической значимости. Так, число ретикулоцитов в периферической крови мышей группы 5, которых начинали лечить сразу после облучения по схеме МСК→СКК с интервалом 24 часа, превышало в 5 раз этот показатель у мышей облученного контроля и соответствовало показателю интактных животных. Следует отметить также большую сохранность показателей системы крови в этой группе по сравнению с показателями группы 4, получавшей стволовые клетки не сразу после облучения, а спустя 1 сутки. При отсутствии значимого положительного эффекта по общей клеточности костного мозга выявля-

ется увеличение общей клеточности селезёнки, что также более значимо (в 2,5 раза) в группе 5, и может свидетельствовать о возможной активации её кроветворной функции в отношении эритроцитарного ростка.

Таким образом, проведенное исследование выявило отчетливый положительный эффект на процессы восстановления кроветворения при аплазии костного мозга, вызванной тотальным облучением электронами в дозе 8,2 Гр, с помощью котрансплантации мезенхимальных и гематопо-

этических стволовых клеток. Наиболее эффективной из апробированных схем сочетания МСК и СКК, способствующей восстановлению костномозгового кроветворения, по нашим данным, следует считать схему с алгоритмом введения стволовых клеток МСК→СКК с интервалом 24 часа между введениями и непосредственным после облучения началом лечения.

Литература:

1. Севаньяева Л.Е., Южаков В.В., Конопляников А.Г., Романко Ю.С., Бандурко Л.Н., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Конопляников М.А., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г. Радиосенсибилизирующее действие мезенхимальных стволовых клеток человека при локальном воздействии G-излучения на саркому М-1 крыс // Радиация и риск. 2017. Т. 26, №3. С.100-115.
2. Angelopoulou M., Novelli E., Grove J.E. Rinder H.M., Civin C, Cheng L, Krause D.S.. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice.// Exp. Hematol. 2003. Vol. 31. N 5. P. 413-420.
3. An N., Cen B., Cai H., Song J.H., Kraft A., Kang Y. Pim1 kinase regulates c-Kit gene translation. // Exp. Hematol. Oncol. 2016. Dec 30; doi: 10.1186/s40164-016-0060-3. eCollection 2016.
4. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. // J Orthop. Res. 1991. Vol. 9, N 5. P. 641-650.
5. Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M., Fouillard L., Young R.G., Frick J., Demarquay C., Cuvelier F., Mathieu E., Trompier F., Dudoignon N., Germain C., Mazurier C., Aigueperse J., Borneman J., Gorin N.C., Gourmelon P., Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when coinjected with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. // J. Gene. Med. 2003. V 5, N 12. P. 1028-1038.
6. Ferrari G., Gusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. Vuscle regeneration by bone marrowderived myogenic progenitors // Science. 1998. Vol. 279, (5356). P. 1528-1530
7. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W., Dyhouse S.M., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Lazarus H.M. Rapid hematopoietic recovery after coinjection of autologous-blood stem cells and cultureexpanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. // J. Clin. Oncol. 2000. Vol. 18, N 2. P. 307-316.
8. Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M., Curtin P., Maziarz R.T., Holland H.K., Shpall E.J., McCarthy P., Atkinson K., Cooper B.W., Gerson S.L., Laughlin M.J., Loberiza F.R. Jr., Moseley A.B., Bacigalupo A. Cotransplantation of HLA-identical sibling cultureexpanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. // Biol Blood Marrow Transplant. 2005. Vol. 11, N5. P. 389-398.
9. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, Ljungman P, Lunnies H, Nava S, Ringdän O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. // Leukemia. 2007. Vol. 21, N 8. P. 1733-1738.
10. Reya T. Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal //Recent. Prog. Horm. Res. 2003. Vol. 58, N 2. P. 283-295.
11. Tsyb A.F., Yuzhakov V.V., Konoplyannikov A.G., Yakovleva N.D., Ingel I.E., Bandurko L.N., Sevan'kaeva L.E., Mikhina L.N., Fomina N.K., Konoplyannikova O.A., Kal'sina S.Sh., Lepkhina L.A., Semenkova I.V., Agaeva E.V., Shevchuk A.S., Pavlova L.N., Tokarev O.Yu., Roshal' L.M., Sushkevich G.N., Semenova ZH.B., Karaseva O.V., Chernyshova T.A., Sukhikh G.T., Marei M.V. Morphofunctional study of the therapeutic efficacy of human mesenchymal and neural stem cells in rats with diffuse brain injury.// Byull. Eksp. Biol. Med. 2009. Vol. 147, N 1. P. 132-146.