

Использование мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, в лечении состояния острой кровопотери у крыс

Мамбетпаева Б. С., Кульмаганбетова Н. М., Алтаева Н. З.,
Абдрахманова Б. М., Кабибулатова А. Е.
НАО "Астана Медицинский Университет"

DOI: 10.5281/zenodo.3270888

АКТУАЛЬНОСТЬ:

Использование достижений клеточной терапии приобретает большую перспективу по всему миру. Клеточная терапия, а именно использование стволовых клеток, предлагает совершенно новый, инновационный подход в лечении различных заболеваний [1].

Стволовые клетки применяют в кардиологии, неврологии, травматологии при таких состояниях, как инфаркт миокарда, рассеянный склероз, апластическая анемия [3], положительный эффект также отмечается в регенерации костной ткани при трансплантации МСК после переломов [4].

МСК привлекли внимание ученых и клиницистов из-за их мультилинейного дифференцировочного потенциала, низкой иммуногенности и активного участия в восстановлении и регенерации тканей после миграции в участки повреждения [5].

На данный момент в мировой медицинской практике накоплен определенный опыт успешного применения МСК в комплексной терапии различных системных заболеваний рассеянный склероз, сахарный диабет, печеночная недостаточность, постинсультные состояния а также в травматологии и стоматологии. Кроме того, МСК могут быть использованы для лечения ожогов различной локализации и этиологии, келоидных и гипертрофических рубцов, заживления трофических язв, пролежней, ишемии нижних конечностей, токсических гепатитов [10].

Были описаны два основных типа стволовых клеток: эмбриональные стволовые клетки и взрослые стволовые клетки. Проблема получения эмбриональных стволовых клеток, их культивирование и трансплантация это - целый набор сложных этических проблем. В связи с этим использование взрослых мезенхимальных стволовых клеток является менее проблематичным. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются стромальными клетками, которые обладают способностью к самообновлению, а также имеют многоуровневую дифференцировку.

Мезенхимальные стволовые клетки являются предшественниками целого ряда тканей человека и имеют широкий спектр возможного применения в регенеративной медицине. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обнаружены и могут быть выделены из различных источников (костного мозга, жировой ткани, плаценты, пупочного канатика, пульпы молочного зуба, эндометрия, печени и т.д.) [5,2, 8].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) — это плюрипотентные стволовые клетки взрослого организма, терапевтический эффект которых основан на их дифференцировочном потенциале в направлении ряда соматических клеточных линий, а также на способности выделять ряд сигнальных молекул, мо-

делирующих функциональную активность различных клеток организма [2].

Фриденштейн А.Я. впервые описал и экспериментально подтвердил существование в костном мозге и лимфоидных органах стволовых стромальных клеток. Эти открытия подтвердили, что костный мозг содержит отдельную популяцию стволовых клеток, способных образовывать клоны клеток кроветворной и соединительной ткани. Около 30% аспириата клеток костного мозга, выделенного Фриденштейном, состояли из мезенхимальных стволовых клеток. Эти клетки обладали адгезией к пластику, были способны поддерживать рост и дифференциацию различных гемопоэтических клеточных линий [6, 3,4].

Стоит отметить, что получены данные о гемостимулирующем действии МСК, обусловленном секрецией ряда цитокинов, таких как ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-14, ИЛ-15, фактор LIF (leukemia-inhibitory factor), макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ), грануляционно-макрофагальный колониестимулирующий (ГМ-КСФ), фактор роста стволовой клетки. Выделяя данные сигнальные молекулы МСК способствуют росту гемопоэтических предшественников, создавая для них необходимое микроокружение. МСК также могут способствовать миграции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), экспрессируя хоуминг-рецепторы и хемокины, например, SDF-1 (stromal-derived factor – 1) [8,9,10].

Сегодня признанной считается сочетанная трансплантация МСК и ГСК, эффективность которой основана на данных о том, что МСК способны стабилизировать и способствовать дифференцировке введенных ГСК [11].

В данном научном исследовании мы изучили влияние МСК на активацию гемопоэза после перенесенной острой кровопотери. При этом не использовалась принятая сегодня сочетанная трансплантация мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток. Нами был исследован другой подход к лечению острой кровопотери, включающий трансплантацию сниженной дозы [12] только мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани.

Несмотря на то, что костный мозг является основным источником получения МСК, его выделение представляет инвазивную и травматичную процедуру. Более того, обнаружено, что количество, дифференцировочный потенциал и жизнеспособность МСК костного мозга резко снижается с возрастом. [7]. В этой связи проводится поиск альтернативных источников получения МСК. Одним из таких источников может служить жировая ткань [8]. Жировая ткань может быть получена менее инвазивным способом и

в большем количестве, чем костный мозг. Было показано, что жировая ткань, содержит стволовые клетки, которые можно легко выделить и размножить в условиях *in vitro*. Стромальные клетки жировой ткани обладают схожим с МСК костного мозга иммунофенотипом и способностью к мультилинейной дифференцировке.

Терапевтический эффект применения МСК обусловлен как их способностью воздействовать с помощью секреторируемых веществ на клетки реципиента, так и их способностью дифференцироваться в клетки крови, остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Процесс дифференцировки может контролироваться в лабораторных условиях, что позволяет получить полностью или частично дифференцированный материал для клеточной терапии [9].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: экспериментальное обоснование применения культур мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, для регенерации клеток крови после острой кровопотери.

ЗАДАЧИ РАБОТЫ:

1. Провести сравнительный анализ характеристик мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани крыс и выбрать оптимальный тип клеток для лечения острой кровопотери у крыс.

2. Смоделировать метод острой кровопотери у лабораторных крыс.

3. Изучить влияние оптимального типа мезенхимальных стволовых клеток, на активацию гемопоэза.

4. Исследовать динамику изменения количества клеток крови в опытной и контрольной группе лабораторных животных.

5. Сделать выводы об эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток при лечении острой кровопотери.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:

В данном исследовании использовали аутбредных крыс-самцов линии Wistar весом 250-300 гр., которые были приобретены из питомника лабораторных животных «Пушино» (Россия) <http://www.spf-animals.ru>. Животные содержались в условиях вивария включающий 12 часовый цикл день/ночь, при температуре 22-23°C. Все эксперименты с животными проводились только после одобрения локального этического комитета.

1. Выделение и культивирование МСК костного мозга крыс.

Для выделения клеток костного мозга, животных умервщляли с помощью установки для эвтаназии, согласно инструкции производителя ООО «НПК Открытая Наука» (РФ). Костный мозг выделяли из бедренных костей животных. Для выделения клеток костного мозга, животных умервщляли с помощью установки для эвтаназии, согласно инструкции производителя ООО «НПК Открытая Наука» (РФ). Костный мозг выделяли из бедренных костей животных. Оба конца кости отрезали и вымывали костный мозг питательной средой α -МЕМ при помощи 5 мл шприца. Полученную клеточную суспензию профильтровывали через 70 мкм нейлоновый клеточный фильтр (Beckton-Dickenson, USA), ресуспендировали в среде α -МЕМ, подсчитывали в камере Нойбауэра количество клеток и культивировали в

полной питательной среде α -МЕМ, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Через 3 дня неприкрепленные к пластику клетки удаляли промыванием фосфатно-солевым буфером (ФСБ), а фракцию адгезивных клеток культивировали до покрытия клетками 80-90 % площади культурального флакона. Пассирование клеток производили рекомбинантным трипсином TrypLE Express (Life Technologies, UK) с интервалом 6-7 дней. Смену среды в культуре клеток осуществляли через каждые 2 дня.

2. Выделение и культивирование МСК жировой ткани крыс.

Жировую ткань выделяли из области почек и отмывали от крови 3 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) содержащий 200 Ед./мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл амфотерицина В. После отмывки жировую ткань измельчали на мелкие кусочки (1-2мм³) с помощью скальпеля и переносили в 15 мл центрифужную пробирку. Добавляли 8 мл прогретого ФСБ и встряхивали в течение 45 сек и оставляли на 5 мин. После разделения на фазы инфранатант удаляли аспирированием. Данную процедуру повторяли 4 раза. Затем к кусочкам жировой ткани добавляли 10 мл 0,25% раствор коллагеназы I типа и инкубировали в течение 60 минут при 37 °C в водяной бане, тщательно перемешивая каждые 10 минут. Полученную клеточную суспензию профильтровывали через нейлоновый клеточный фильтр 70 мкм (Becton Dickenson, USA) для удаления оставшихся фрагментов ткани, ресуспендировали в полной питательной среде α -МЕМ, содержащей 10% ЭТС, 2 мМ глутамакса, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки подсчитывали в камере Нойбауэра и культивировали при 37 °C и 5% CO₂. Через 2 дня неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а фракцию адгезивных клеток культивировали до покрытия клетками 80-90% площади культурального флакона. Пассирование клеток производили рекомбинантным трипсином (TrypLe Express, Life Technologies, USA) с интервалом 6-7 дней. Смену среды в культуре клеток осуществлялась через каждые 2 дня.

3. Тест на образование фибробластных колониеобразующих (КОЕ) единиц.

Клетки выделенные из костного мозга крыс рассеивали в культуральные флаконы T25 с расчетом 10 клеток/см² и культивировали в полной питательной среде в течение 14 дней при 37°C и 5% CO₂. По окончании срока культивирования, клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и окрашивали 0,5% раствором кристаллического фиолетового в течение 5 мин при комнатной температуре. После двукратной отмывки ФСБ проводили подсчет образовавшиеся колоний с использованием стереомикроскопа SZ61 (Olympus, Germany). Снимки получали с помощью CCD-камеры SC-100 (Olympus, Germany).

4. Иммуноцитохимический анализ.

Клетки рассеивали на 4-луночный слайд по 1 Ч 10⁵ клеток на лунку и инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе для образования монослоя. Затем,

монослой клеток фиксировали свежеприготовленным раствором 4% параформальдегида в ФСБ (рН 7,2) в течение 20 мин. После пятиминутной обработки тритоном X-100 клетки отмывали три раза ФСБ и добавляли 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 30 мин. Далее клетки инкубировали с антителами против CD90, CD105, CD73 и CD45. Для приготовления необходимой концентрации, антитела разводили в растворе, содержащем 1% БСА и 0,2% Tween 20 в фосфатном буфере. Первичные антитела разводили в следующем соотношении: мышинные моноклональные антитела против CD90 (1:200), CD105 (1:100), CD45 (1:100), (Abcam, UK), кроличьи антитела против CD73 (1:200), (Abcam, UK). Инкубирование препаратов клеток в растворе антител проводили при 37°C в течение 1 часа. После трех пятиминутных отмывок в растворе 0,2% Tween 20 в фосфатном буфере к препаратам клеток наносили раствор козьих анти-кроличьих и анти-мышинных антител (1:500), конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Life Technologies, UK) и инкубировали 45 мин при 37°C в темноте. Клетки отмывали от раствора антител три раза по 5 мин. 0,2% раствором Tween 20. После высушивания, на слайд наносили по 20 мкл антивыгорающего раствора с красителем DAPI (Life Technologies, UK). Препараты анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Germany) и программного обеспечения Zen 2011. Обработку полученных снимков проводили с помощью программы Image J.

5. Тест на пролиферацию.

МСК крысы рассеивали в культуральные флаконы (TPP, Швейцария) при посевной плотности 1×10^3 клеток/см² и культивировали в полной пита-

тельной среде α -MEM с содержанием 20% ЭТС. Культивирование клеток проводили в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Подсчет клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток TC 20 (BioRad, США) через каждые 24 часа.

6. Моделирование и лечение острой кровопотери у крыс.

Эксперимент по трансплантации МСК был выполнен на крысах массой 200-250 гр. Массивную кровопотерю вызывали кровопусканием из хвостовой вены крысы в объеме 2% от массы тела, что составляло приблизительно 30% от объема циркулирующей крови (ОЦК). Далее кровотечение останавливали тугой повязкой. Животные были разделены на две группы: опытную (n=17) и контрольную (n=17). Как опытная, так и контрольная группы содержались в условиях вивария при температуре 22-23°C с доступом к пище и воде.

7. Статистическая обработка данных.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты статистической обработки экспериментальных данных представлены в виде графиков с указанием величины среднего квадратичного отклонения.

Результаты и обсуждение

Сравнительная характеристика клеток, выделенных из жировой ткани и костного мозга крыс, на их соответствие минимальным критериям МСК показала, что вне зависимости от тканевого источника исследуемые клетки обладали хорошей адгезивной способностью, имели фибробластоподобную морфологию и крупное овальное ядро с характерными двумя или более ядрышками (рисунок 1).

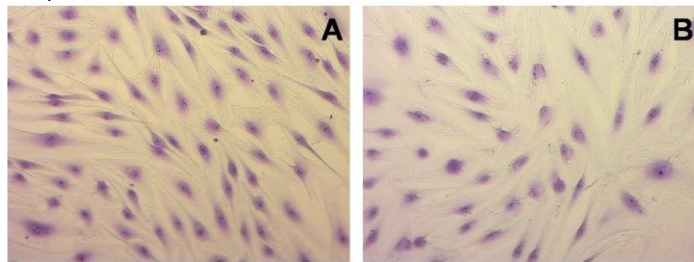


Рисунок 1 - Морфология МСК костного мозга (А) и жировой ткани (В) крыс. Окрашивание кристаллическим фиолетовым. Увеличение $\times 100$.

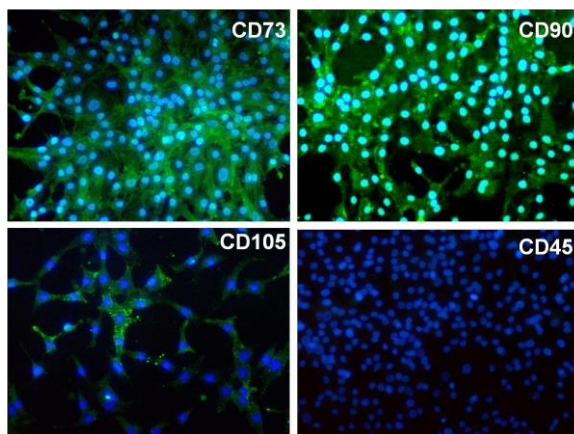


Рисунок 2 - Фенотипическая характеристика МСК костного мозга крыс. Показана экспрессия

поверхностных маркеров МСК (зеленый): CD73, CD90, CD105. Ядра клеток окрашены красителем DAPI (синий). Увеличение $\times 100$.

Результаты иммуноцитохимического анализа также показали, что МСК костного мозга и жировой ткани имеют одинаковый фенотип с достоверно выраженной экспрессией CD105, CD90 и CD73 (рисунок 2).

Окрашивание клеток антителами к поверхностному маркеру CD45, не выявило никаких примесей гемопоэтических клеток. Таким образом, выделенные МСК костного мозга и жировой ткани являются фенотипически гомогенной клеточной популяцией.

Дальнейший анализ морфо-функциональных характеристик фибробластоподобных клеток показал, что МСК жировой ткани крысы обладают

более высокой клоногенной и пролиферативной активностью по сравнению с МСК костного мозга, как показано на рисунках 3 и 4.

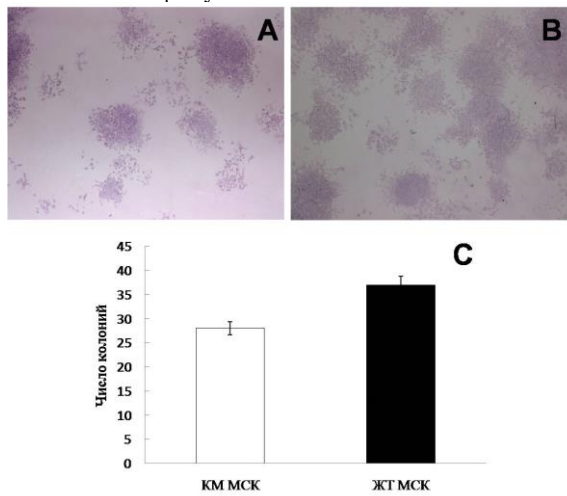


Рисунок 3 - Клоногенная активность МСК костного мозга (А) и жировой ткани (В) крыс. Количество клоногенных прекурсоров МСК костного мозга и жировой ткани крыс (С).

Так, результаты теста на колониеобразование показали, что МСК жировой ткани образовывали 37 ± 4 колоний, тогда как МСК костного мозга формировали 28 ± 3 колоний. При оценке пролиферативной активности также было обнаружено, что МСК жировой ткани способны к более интенсивному делению, чем МСК костного мозга крыс. Особенно это было заметно на 6-й и 7-й день культивирования клеток, когда количество МСК жировой ткани превышало число МСК костного мозга примерно в 2 раза (рисунок 4).

В нашей работе мы выяснили, что МСК из жировой ткани может быть использован, как инновационный метод терапии при различных патологических

состояниях. В дальнейшем мы работали с МСК из жировой ткани для лечения состояния после острой кровопотери у крыс. Спустя 1 час после острой кровопотери крысам опытной группы была проведена внутрибрюшинная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, в размере 1,2 млн клеток/крысу. После трансплантации пульс и дыхание сохранялись ровными, ритмичными. Контрольная группа после перенесенной кровопотери терапию стволовыми клетками не получала, но как и опытной группе была внутрибрюшинно сделана инъекция физиологического раствора.

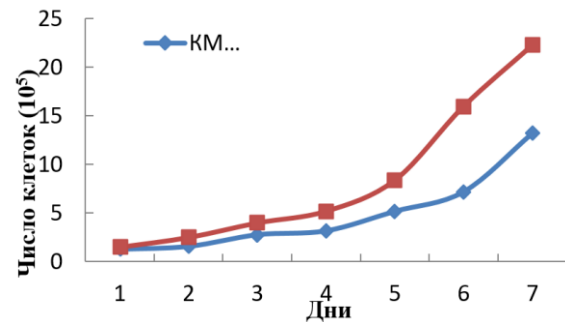


Рисунок 4 - Пролиферативная активность МСК костного мозга и жировой ткани крыс.

Динамика изменения количества клеток крови измерялась путем забора образцов крови на 7, 14 и 30 сутки после кровопотери. Подсчет эритроцитов и лейкоцитов осуществлялся с помощью камеры Горяева. Также изучалась лейкоцитарная формула путем создания мазков-отпечатков и их стандартным окрашиванием по Романовскому – Гимзе. При анализе периферической крови уже начиная с первой недели, наблюдалась достоверная разница в количестве эритроцитов между животными опытной и контрольной групп.

Параметр	Пройденные сутки после кровопотери							
	Норма		7 сутки		14 сутки		30 сутки	
	опыт	контроль	опыт*	контроль	опыт**	контроль	опыт***	контроль
Эритроциты (Г/л)	10,65	10,59	7,77	5,38	8,75	6,04	10,65	8,11
Лейкоциты (Г/л)	4,59	6,03	6,36	6,82	7,21	6,96	11,21	9,75
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	24,71	16,59	18,88	16,53	11,59	13,12	11,53	14,35
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	10,00	15,29	14,00	16,24	21,82	18,47	20,71	22,94
Эозинофилы (%)	1,00	2,06	1,06	1,00	2,06	2,06	3,41	2,76
Моноциты (%)	3,65	4,18	4,18	3,59	4,18	4,00	4,65	4,47
Лимфоциты (%)	59,35	61,18	61,82	62,65	60,06	61,71	59,88	54,65

*различие в количестве эритроцитов между опытной и контрольной группами достоверно при $p < 0.05$;
 **различие в количестве эритроцитов в опытной группе достоверно по сравнению с 7 сутками при $p < 0.05$;
 ***различие в количестве эритроцитов в опытной группе достоверно по сравнению с 14 сутками при $p < 0.05$

На 7 сутки количество эритроцитов в опытной группе было на 30,73% больше, чем в контроле. Более того, положительные тенденции сохранились на 14 сутки, и разница в количестве эритроцитов между опытной и контрольной группами составила 31,05%. На 30 сутки различие в количестве эритроцитов составило 23,85%, при этом опытная группа полностью восстановила первоначальный уровень эритроцитов.

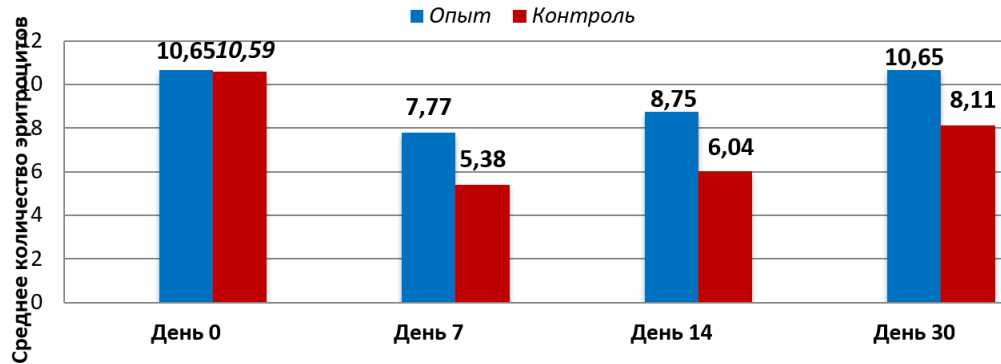
Стоит отметить, что в данном исследовании применялась только трансплантация МСК без дополнительного введения коллоидных, кристаллоидных растворов или другой стандартной терапии [14].

Таким образом, данное исследование отличается от признанной сегодня сочетанной трансплантации гемопоэтических и костномозговых мезенхимальных стволовых клеток тем, что были использованы только мезенхимальные стволовые клетки выделенные из

жировой ткани и была сравнительно снижена доза введенных стволовых клеток по отношению к массе тела животных. Несмотря на это, наблюдались принципиальные различия в количестве эритроцитов в крови животных опытной и контрольной групп.

Кроме того, данный метод позволяет за меньшее время восстановить количество эритроцитов крови без использования стандартной терапии.

Динамика количества эритроцитов



ВЫВОДЫ:

1. Сравнительный анализ показал, что МСК костного мозга и жировой ткани имеют одинаковые морфологические и фенотипические характеристики. Однако МСК жировой ткани обладают более высокой пролиферативной и клоногенной активностью, чем костного мозга МСК крысы. Более того, было обнаружено, что МСК жировой ткани лучше дифференцируются в другие типы клеток. Результаты сравнительных исследований различных типов МСК могут иметь и практическую ценность, например, для оптимизации технологий трансплантации МСК при определенных патологиях. В ходе исследо-

ваний мы решили использовать МСК из жировой ткани для лечения острой кровопотери у крыс.

2. На основании полученных результатов можно констатировать, что трансплантация мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани является эффективным способом стимуляции гемопоэза и более быстрого восстановления организма после перенесенной острой кровопотери. Полученные данные предполагают в последующем постановку соответствующих задач по изменению дифференцированного подхода к лечению синдрома кровопотери в клинической практике.

Литература:

1. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Активация регенерации кроветворной ткани с помощью стволовых клеток после острой кровопотери // *Вестник уральской медицинской академической науки*.- 2012г. - №5. - С. 35-37.
2. Dr. Jan Barfoot, Kate Doherty et al. Stem Cell Research: Trends and Perspectives on the Evolving International Landscape
3. Gonzaga V.F., Wenceslau C.V., Lisboa G.S., Frare E.O., Kerkis I. Mesenchymal stem cell benefits observed in bone marrow failure and acquired aplastic anemia
4. Михайличенко В.Ю., Самарин С.А., Эстрин С.И. Сравнительный анализ клеточной кардиомиопластики мезенхимальными и эмбриональными стволовыми клетками при экспериментальном инфаркте миокарда, РФ, Республика Крым, г.Симферополь и г.Донецк, Украина
5. Aqmasheh S., Shamsasanjan K. et al. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells, Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
6. Noort W.A., Kruijselbrink A.B., in't Anker P.S. et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood – derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 870-8.
7. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture – expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J.Clin.Oncol.* 2000; 18: 307-16.
8. Кругляков П.В., Лохматова Е.А., Климович В.Б., Зарицкий А.Ю. Мезенхимальные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*.- 2006.- №3(5).- С.36-41.
9. Zhao R.C., Liao L., Han Q. Mechanisms and perspectives on the mesenchymal stem cells in immunotherapy. *J. Lab. Clin. Med.* 2004; 143:284-91.
10. Jorgensen C., Djouad F., Apparailly F. et al. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Therapy* 2003; 10: 928-31.
11. Гребнев Д.Ю. Перспектива применения сочетанной трансплантации стволовых клеток для восстановления гемопоэза / *Вестник уральской медицинской академической науки* №3 (40), 2012. – С. - 67-68.
12. Nakao N., Nakayama T., Yahata T., Muguruma Y., Saito S., Miyata Y., Yamamoto K., Naoe T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo

13. Isolation of adipose tissue derived mesenchymal stem cells by Lopez M.J., Spencer N.D. In vitro adult rat adipose tissue-derived stromal cell isolation and differentiation // *Methods of molecular biology described method*

14. Богдан В.Г., Гаин Ю.М. Проблема острой кровопотери в хирургии. Основные средства инфузионно - трансфузионной терапии. Препараты (компоненты) крови, ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

15. Кауламбаева М.З., Амиргазиева М.К., Стабаева Г.С., Бименов Қ.С., Орекешова А.М. Применение клеточных технологий для профилактики несостоятельности легочных швов в эксперименте/ Материалы III Международного Симпозиума «Актуальные вопросы клеточных технологий» // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* Том 5 №3. – 2010. – С. - 32-33.