

СТИМУЛЯЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И КОСТНОМОЗГОВОГО ГЕМОПОЭЗА С ПОМОЩЬЮ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ПРИ ДЕЗАДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА

Я.В. Латюшин*, Н.Ю. Шелгаев**, В.И. Павлова*, В.П. Шахов***

*Челябинский государственный педагогический университет, г. Челябинск;

**Государственное учреждение здравоохранения Челябинский областной кожно-венерологический диспансер, г. Челябинск;

***Томский политехнический университет, г. Томск

Исследовалось влияние стресса, вызванного 12-часовой иммобилизацией мышцей линии Balb/c на систему гемопоэза и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга. Экстремальное воздействие приводит к развитию дезадаптации со стороны костномозгового кроветворения как на уровне гемопоэтических, так и мезенхимальных стволовых клеток. После лейкоцитоза (1 сутки) наблюдается депрессия лейкопоэза и снижение общего количества миелокариоцитов в костном мозге. Введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при стрессе оказывает защитное действие на кроветворение. Граноцит можно использовать как профилактическое средство лицам, подверженным частым стрессам и дисадаптации.

Ключевые слова: стволовые клетки, стресс, адаптация, гемопоэз, мезенхимопоэз, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

Адаптация организма к действию экстремальных факторов включает в себя сложный механизм, включающий в себя слаженную работу ключевых гомеостатических систем (нейроэндокринная, иммунная, кроветворная и др.). В зависимости от силы экстремального воздействия или патологического процесса, наблюдается повышение общей устойчивости организма или ее снижение. Причем переход от одного состояния к другому может иметь колебательную форму [9, 4, 5, 11, 1]. Особая роль в данном механизме принадлежит мезенхимальным стволовым клеткам (МСК) [5, 8, 14, 16]. Именно им также принадлежит важная роль в формировании специфического микроокружения многих органов, включая костный мозг. Они являются основной матричной единицей, так называемых «ниш», которая регулирует процессы пролиферации и дифференцировки, окружающих мезенхимальный элемент, стволовых клеток других гистогенетических линий, в частности гемопоэтических прекурсоров [17, 20]. В свою очередь гемопоэтические стволовые клетки дают начало более дифференцированным потомкам миелопоэза, эритропоэза и тромбоцитопоэза, из которых формируются клетки крови [7, 13]. Дисбаланс в работе МСК и гемопоэтических клеток-предшественников под действием стрессора сопровождается уменьшением общего количества кариоцитов, в результате чего развиваются лейкопения и (или) анемия и, как следствие, снижение резистентности организма к действию неблагоприятных факторов [5, 13]. С теоретических позиций для борьбы с

этим патологическим процессом можно использовать разного рода ростовые факторы, стимулирующие гемопоэз, включая цитокины, интерлейкины, колониестимулирующие факторы и т.п. [6, 10]. С этих позиций большой интерес представляет собой гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), который является естественным ростовым фактором для миелопоэза как на уровне кроветворных клеток-предшественников, так и их более дифференцированных потомков – нейтрофилов и моноцитов. Кроме того, Г-КСФ может мобилизовать МСК из костного мозга в кровь. Однако эти работы касаются преимущественно заболеваний со стороны сердечно-сосудистой системы. Интегральное воздействие данного цитокина на мезенхимальные и гемопоэтические стволовые клетки костного мозга при стрессе остается неясным [6, 10, 18, 3].

В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение роли действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на мезенхимопоэз и миелопоэз при действии на организм экстремальных факторов.

Материалы и методы. Опыты были проведены на 55 самцах мышей линии Balb/c массой 18–21 г. Животные в общепринятых условиях и стандартной диете. В опыты отбирались только здоровые животные, прошедшие двухнедельный карантин в условиях вивария. Все манипуляции с лабораторными животными осуществляли согласно существующей Хельсинской декларации.

Иммобилизационный стресс (ИС) вызвали

путем фиксации животных на спине в течение 12 часов как было описано ранее [5]. Контрольных животных содержали по 10–12 особей в обычных клетках.

В качестве Г-КСФ мы использовали рекомбинантный фармакологический препарат «Граноцит» фирмы «Aventus», который вводили подкожно в дозе 50 мкг/кг в течение 3 суток после иммобилизации [16].

На 1, 3, 5, 7 и 10 сутки после иммобилизации в периферической крови определяли содержание общего количества эритроцитов, лейкоцитов, с подсчетом лейкоцитарной формулы [12]. На 3, 5, 7 и 10 сутки часть животных забивали, подсчитывали общую клеточность костного мозга, делали миелограмму и культивировали клетки в системе *in vitro*. Определение общего количества мезенхимальных стволовых клеток осуществляли по стандартной методике [12]. Костный мозг вымывали из бедренной кости с помощью шприца средой DI-MEM, доводили общее количества жизнеспособных кариоцитов до 1×10^6 /мл в полной культуральной среде (ПКС), которая состояла из: 90 % среды DI MEM, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 200 мМ L-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина (все реактивы фирмы «Sigma», США). Клетки разливали в 50 мл пластиковые флаконы фирмы «Falcon» (по 5 мл на флакон) и инкубировали при 37 °С, 100 % влажности, 5 % CO₂ в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе. Затем удаляли не адгезирующие клетки и меняли полную питательную среду на свежую порцию. Материал культивировали в течение 14 суток с заменой полной питательной среды каждые 3 суток при 37 °С, 100 % влажности, 5 % CO₂ в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе. После чего с помощью инвертоскопа подсчитывали число выросших колоний (агрегатов, содержащих более 50 клеток) с последующей окраской азур-II эозином [12].

Гранулоцитарные колониеобразующие клетки костного мозга исследовали по общепринятой ме-

тодике путем культивирования в полутвердом бактоагаре фирмы «Difco» (США), 35 мм чашках Петри фирмы «Falcon» при 37 °С, 100 % влажности, 5 % CO₂ в течение 7 суток в CO₂-инкубаторе. В полную культуральную среду дополнительно добавляли 0,3 % бактоагара и препарат «Граноцит» в дозе 10 мкг/мл. На 7 сутки подсчитывали общее количество колоний и кластеров (колониальные агрегаты, содержащие более 50 клеток, кластеры от 3 до 50) с последующим извлечением отдельных колоний и окраской их азур-II эозином [12].

Статистическую обработку полученных данных проводили с вычислением t-критерия Стьюдента при помощи компьютерной программы «Statistica 7» с определением M – выборочное среднее, m – ошибка среднего и p – достигнутый уровень значимости.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что иммобилизационный стресс вызывает развитие лейкоцитоза на 1 сутки опыта. При этом наблюдалось развитие нейтрофилии (на $175,3 \pm 12,1$ % от фона, Pt < 0,05) и лимфопения (до $43,8 \pm 5,3$ % от фона, Pt < 0,001), затем сменяется лейкопенией, которая продолжается до 5 суток. К 10 суткам эксперимента общее количество лейкоцитов нормализуется (табл. 1).

В костном мозге наблюдается падение общего количества миелокариоцитов (ОКК), начиная с 1 по 5 сутки опыта, которое возрастает на 7 день, а затем возвращается к исходным величинам (10 сутки) (см. табл. 1). Содержание гранулоцитомакрофагальных колоние-и кластеробразующих единиц (ГМ-КОЕ, ГМ-КлОЕ) при иммобилизационном стрессе снижается на 1,3 сутки, после чего наблюдается их гиперплазия (5,7 сутки) и последующая нормализация к 10 дню исследования до исходных параметров (табл. 1). Общее количество МСК снижается на 1 сутки опыта, после чего их количество достоверно увеличивается к 3,5,7 суткам, а на 10 день возвращается к исходным вели-

Таблица 1

Динамика общего количества лейкоцитов (ОКЛ) в периферической крови, общее количество кариоцитов (ОКК), количество ГМ-КОЕ, ГМ-КлОЕ, МСК в костном мозге мышей линии Balb/c до и после 12-часовой иммобилизации ($\bar{X} \pm m$, Pt)

Время после иммобилизации	ОКЛ, $\times 10^9$ /л	ОКК в костном мозге, $\times 10^9$ /л	ГМ-КОЕк, $\times 10^6$	ГМ-КлОЕк, $\times 10^6$	МСК, $\times 10^6$
Контроль	$23,3 \pm 1,3$	$18,7 \pm 0,1$	$10,5 \pm 0,3$	$54,3 \pm 1,7$	$1,4 \pm 0,1$
1 сутки	$27,7 \pm 0,5$ < 0,05	$11,5 \pm 0,5$ < 0,001	$4,3 \pm 1,7$ < 0,001	$31,5 \pm 2,3$ < 0,001	$0,3 \pm 0,1$ < 0,01
3 сутки	$16,5 \pm 0,9$ < 0,05	$13,4 \pm 1,3$ < 0,01	$5,1 \pm 0,7$ < 0,001	$35,1 \pm 4,1$ < 0,01	$2,1 \pm 0,3$ < 0,05
5 сутки	$17,8 \pm 2,1$ < 0,05	$15,3 \pm 0,5$ < 0,05	$16,2 \pm 1,5$ < 0,05	$66,1 \pm 2,1$ < 0,05	$3,5 \pm 0,5$ < 0,01
7 сутки	$18,1 \pm 3,3$ > 0,05	$23,1 \pm 0,3$ < 0,05	$15,6 \pm 0,3$ < 0,01	$69,9 \pm 1,1$ < 0,05	$1,9 \pm 0,3$ > 0,5
10 сутки	$22,9 \pm 3,7$ > 0,5	$19,3 \pm 0,9$ > 0,5	$11,5 \pm 1,3$ > 0,5	$55,9 \pm 3,1$ > 0,5	$1,5 \pm 0,5$ > 0,5

чинам (табл. 1, рис. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что при стрессе в костном мозге после общей супрессии кроветворения и мезенхимопоза, наблюдаемой со стороны МСК и ГМ-КОЕ, ГМ-КлОЕ, происходит последовательный запуск регенераторного механизма, который направлен сначала на восстановление микроокружения костного мозга за счет мезенхимальных клеток, а затем – кроветворной ткани на уровне гемопоэтических прекурсоров и их дифференцированных потомков.

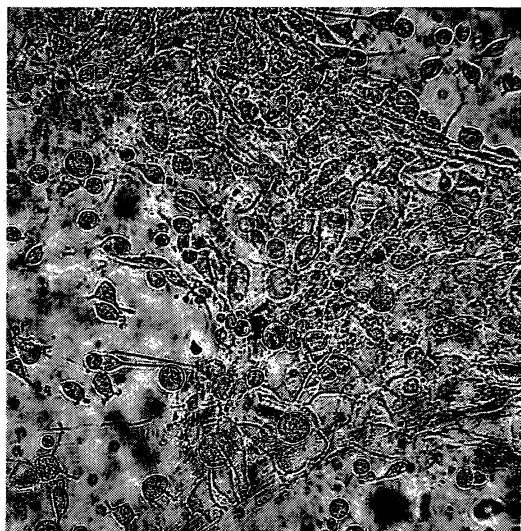


Рис. 1. Фрагмент мезенхимальной колонии, выросшей на 14 сутки культивирования в системе *in vitro* из клеток костного мозга мышей линии Balb/c на 7 сутки после иммобилизации. Фазово-контрастная микроскопия, ув. 400х.

Введение Г-КСФ животным во время иммобилизации нивелирует негативные изменения как со стороны мезенхимальных, так и гранулоцитомакрофагальных стволовых клеток, а также состояние костномозгового кроветворения и картины крови. При этом резкого падения числа со стороны исследуемых родоначальных клеток стромы

и миелопоэза практически не происходит (табл. 2). Установлено, что препарат «Граноцит» оказывает протекторное действие на систему крови и элементы, формирующие микроокружение костного мозга – МСК. Количество МСК в костном мозге возрастает на 5 сутки более чем в 7 раз (см. табл. 2). При этом уже к 5 суткам опыта у животных нормализуется общее количество лейкоцитов в крови и ОКК костного мозга, после чего наблюдается выраженная гиперплазия данного органа (7 сутки опыта) (см. табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что Г-КСФ оказывает прямое стимулирующее действие на клетки белой крови, начиная с миелоидных прекурсоров, а также их более дифференцированных потомков – миелокариоцитов костного мозга и лейкоцитов крови. При стрессе, вызванном иммобилизацией лабораторных животных, данный цитокин тоже оказывает не только протекторное, но и выраженное стимулирующее влияние на миелопоэз как на уровне кардиоцитов костного мозга, так и их недифференцированных клеток-предшественников, включая мезенхимальные прекурсоры (см. табл. 2).

Ранее на модели цитостатической аплазии костного мозга нами было показано, что Г-КСФ не оказывает прямого стимулирующего действия на МСК [2]. Этот механизм, скорее всего, носит опосредованный характер. Очевидно, данный цитокин может активировать костномозговое кроветворение и через другие механизмы, например, с участием клеток эндотелия или других типов стромальных клеток [19, 15]. В результате чего, можно полагать, и происходит восстановление и даже активация процессов пролиферации и дифференцировки МСК (см. табл. 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что стресс, вызванный 12-часовой иммобилизацией, приводит к развитию дезадаптации костномозгового кроветворения как на уровне гемопоэтических, так и мезенхимальных стволо-

Таблица 2
Динамика общего количества лейкоцитов (ОКЛ) в периферической крови, общее количество кардиоцитов (ОКК), количество ГМ-КОЕ, ГМ-КлОЕ, МСК в костном мозге мышей линии Balb/c до и после 12 часовой иммобилизации на фоне введения препарата «Граноцит» (X ± m, Pt)

Время после иммобилизации + «Граноцит»	ОКЛ, ×10 ⁹ /л	ОКК в костном мозге, × 10 ⁹ /л	ГМ-КОЕк, ×10 ⁶	ГМ-КлОЕк, ×10 ⁶	МСК, ×10 ⁶
Контроль (без введения «Граноцита»)	23,3 ± 1,3	18,7 ± 0,1	10,5 ± 0,3	54,3 ± 1,7	1,4 ± 0,1
1 сутки	28,9 ± 1,1 < 0,05	14,3 ± 0,7 < 0,001	4,9 ± 1,7 < 0,001	39,5 ± 3,7 < 0,001	0,5 ± 0,3 < 0,01
3 сутки	21,1 ± 0,5 > 0,05	13,4 ± 1,3 < 0,01	9,1 ± 0,7 > 0,05	49,6 ± 5,3 < 0,01	3,7 ± 0,2 < 0,01
5 сутки	25,8 ± 1,1 < 0,05	15,3 ± 0,5 < 0,05	18,2 ± 1,5 < 0,05	70,1 ± 2,5 < 0,05	3,5 ± 0,5 < 0,01
7 сутки	27,1 ± 2,5 > 0,05	25,3 ± 0,9 < 0,05	17,3 ± 0,1 < 0,05	65,7 ± 1,9 < 0,05	2,5 ± 0,3 < 0,05
10 сутки	23,5 ± 2,9 > 0,5	20,1 ± 1,3 > 0,05	12,3 ± 1,1 > 0,5	61,9 ± 3,1 > 0,5	1,9 ± 0,3 > 0,5

вых клеток. При этом после кратковременного лейкоцитоза наблюдается депрессия лейкопоэза и снижение общего количества миелокариоцитов в костном мозге. Введение Г-КСФ при действии экстремальных факторов оказывает защитное действие на кроветворение. При этом стимулирующее влияние данного цитокина на пул мезенхимальных стволовых клеток носит, по-видимому, опосредованный характер. Его целесообразно использовать не только как фармакологический препарат при лечении лейкопении, лейкозов после химиотерапии или введения цитостатиков, но и как профилактическое средство лицам, подверженным частым стрессам и десинхронизмам.

Литература

1. Абрамов, В.В. Возможные принципы интеграции иммунной и нейроэндокринной систем / В.В. Абрамов // *Иммунология*. – 1996. – № 1. – С. 60–61.
2. Влияние препарата «Граноцит» на мезенхимальные стволовые клетки костного мозга при моделировании вторичного иммунодефицита с помощью циклофосфана в эксперименте / А.Н. Байков, В.П. Шахов, Н.Ю. Шелгаев, В.А. Серебрякова // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 5–8.
3. Влияние цитокинов и аутологических мононуклеарных клеток костного мозга на процессы восстановительной регенерации при инфаркте миокарда / В.В. Рябов, В.А. Марков, Т.Е. Суслова, Ю.С. Попонина, и др. // *Сибирский медицинский журнал*. – 2006. – № 3. – С. 22–25.
4. Горизонтов, П.Д. Стресс и система крови / П.Д. Горизонтов, О.И. Белоусова, М.И. Федотова. – М., 1983. – 240 с.
5. Дыгай, А.М. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза / А.М. Дыгай, В.П. Шахов. – Томск: ТГУ, 1989. – 224 с.
6. Кнорринг, Г.Ю. Цитокиновая сеть как мишень системной энзимотерапии / Г.Ю. Кнорринг // *Цитокины и воспаление*. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 45–49.
7. Репин, В.С. Медицинская клеточная биология / В.С. Репин, Г.Т. Сухих. – М.: Медицина. – 1998. – 200 с.
8. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга и жировой ткани человека: получение, характеристика, возможности дифференцировки / Ю.А. Романов, А.Н. Даревская, Н.В. Мерзлякина и др. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2005. – № 3. – С. 158–163.

9. Селье, Г. Стресс без дистресса / Г. Селье. – М.: Прогресс, 1979. – 124 с.
10. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // *Цитокины и воспаление*. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16–22.
11. Судаков, К.В. Новые аспекты классической концепции стресса // *Бюлл. exper. биол. и мед.* / К.В. Судаков. – 1997. – Т. 123, № 2. – С. 124–128.
12. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / В.П. Шахов, И.А. Хлусов, Г.Ц. Дамбаев и др.; отв. ред. В.В. Новицкий. – Томск: STT, 2004. – 386 с.
13. Ярыгин, К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации / К.Н. Ярыгин // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2008. – № 1. – С. 2–7.
14. Beyer, N. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization / N. Beyer, S.L. Meirelles // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2006. – V. 174. – P. 249–282.
15. Coupling of endothelial injury and repair: an analysis using an in vivo experimental model / S. Nogueras, A. Merino, R. Ojeda, J. Carracedo, M. Rodriguez, A. Martin-Malo, R. Ramirez, P. Aljama // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – V. 294. – № 2. – P. 708–713.
16. da Silva, L.M. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells / L.M. da Silva, A.I. Caplan, N.B. Nardi // *Stem Cells*. – 2008. – V. 26, № 9. – P. 2287–2299.
17. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche / C. Lo Celso, H.E. Fleming, J.W. Wu et al. // *Nature*. – 2009. – V. 457. – P. 92–96.
18. Prophylactic granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor decrease febrile neutropenia after chemotherapy in children with cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials / L. Sung, P.C. Nathan, B. Lange, J. Beyene, G. Buchanan // *Journal of Clinical Oncology*. – 2004. – V. 22, № 16. – P. 3350–3356.
19. Scadde, D.T. The stem-cell niche as an entity of action / D.T. Scadde // *Nature*. – 2006. – V. 441. – P. 1075–1079.
20. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging / Y. Xie, T. Yin, W. Wiegraebe et al. // *Nature*. – 2009. – V. 457. – P. 97–101.

Поступила в редакцию 20 апреля 2009 г.