

УДК 616-092.18

*Д.Ю. Гребнев<sup>1,2</sup>, И.Ю. Маклакова<sup>1,2</sup>, А.В. Осипенко<sup>1</sup>***ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕЛЕЗЕНКИ  
В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ  
ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**<sup>1</sup>Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация;<sup>2</sup>Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Российская Федерация*D. Yu. Grebnev<sup>1,2</sup>, I. Yu. Maklakova<sup>1,2</sup>, A. V. Osipenko<sup>1</sup>***CHANGES IN MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE SPLEEN  
IN CONDITIONS OF EXPOSURE TO IONIZING IZLUCHENIYA AFTER STEM  
CELL TRANSPLANT**<sup>1</sup>Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;<sup>2</sup>Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

**Резюме.** *Целью* проведенного экспериментально-го исследования было изучение влияния сочетанной трансплантации плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток на морфометрические показатели селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения. **Материалы и методы.** Получение клеточной культуры ММСК и ГСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. Изучалось воздействие ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр. Животным опытной подгруппы внутривенно вводилась суспензия ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. кл/кг и 330 тыс. кл./кг, контрольной подгруппе вводили 0,9 % раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после облучения однократно. Оценка регенераторных процессов в красной и белой пульпе селезенки производилась по определению основных морфометрических показателей. **Результаты исследования.** После воздействия ионизирующего излучения на фоне введения стволовых клеток отмечено увеличение размеров лимфоидного фолликула за счет увеличения площади В-зоны фолликула. Также установлено увеличение плотности клеток в красной пульпе селезенки за счет повышения содержания эритроидных элементов и лейкоцитов, увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. **Выводы.** Сочетанная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток после воздействия ионизирующего излучения приводит к увеличению размеров лимфоидного фолликула селезенки, повышению плотности клеток красной пульпы.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки, ионизирующее излучение, регенерация, селезенка, морфометрические показатели

**Abstract.** *The aim* of experimental research was to study the effect of combined transplantation of placental multipotent mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cells on morphometric parameters of the spleen in conditions of exposure to ionizing radiation. **Materials and methods.** Preparation of cell culture MMSC and GSK were made from the chorion of the placenta in laboratory animals. We studied the effects of ionizing radiation at a dose of 4.0 oz. The animals in the test subgroup was injected intravenously suspension MMSC and GSK respectively at a dose of 6 million cells/kg and 330 thousand cells/kg, the control sub-group was injected 0.9% NaCl — 0.2 ml intravenously. Intravenous administration was performed 1 hour after exposure once. Evaluation of regenerative processes in the red and white pulp of the spleen was carried out to determine the morphometric parameters. **The results of the study.** After exposure to ionizing radiation on the background of the introduction of stem cells marked by increase in size of lymphoid follicle due to the increase of the area of the B zone of the follicle. Also the increase in the density of cells in the red pulp of the spleen due to the increase in the content of erythroid cells and leukocytes, increasing the distance between the centers of lymphoid follicles. **Conclusions.** Combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hematopoietic stem cells after exposure to ionizing radiation leads to the increase in the size of lymphoid follicles of the spleen, increasing the density of cells in red pulp.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells, ionizing radiation, regeneration, spleen, morphometric parameters

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Гребнев Дмитрий Юрьевич  
dr-grebnev77@mail.ru

Contact information of the author responsible for correspondence:

Dmitriy Yu. Grebnev  
dr-grebnev77@mail.ru

Дата поступления 12.12. 2017

Received 12.12.2017

Образец цитирования:

Д.Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова, А.В. Осипенко. Изменения морфометрических показателей селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения после трансплантации стволовых клеток. Вестник уральской медицинской академической науки. 2018, Том 15, №1, с. 55–59, DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-1-55-59

For citation:

D.Yu. Grebnev, I.Yu. Maklakova, A.V. Osipenko. Changes in Morphometric Parameters of THE Spleen in Conditions of Exposure to Ionizing Izlucheniya after Stem Cell Transplant. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2018, Vol. 15, no. 1, pp. 55–59. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-1-55-59 (In Russ)

На сегодняшний день актуальной является проблема поиска факторов, способных активировать регенерацию тканей в условиях повреждения [1, 2, 3]. Воздействие ионизирующего излучения (ИИ) реализует свое повреждающее действие преимущественно в быстрообновляющихся тканях [4]. В настоящее время идет активный поиск источников, которые бы позволили получить большее количество стволовых клеток, обладающих повышенным пролиферативным потенциалом и пролиферативной активностью [5]. Таким источником является плацента [6, 7, 8]. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на морфометрические показатели селезенки в условиях воздействия ионизирующего излучения.

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 48 белых лабораторных мышцах-самцах возраста 4–6 месяцев, массой 22 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены на 8 лабораторных животных мышцах-самках возраста 3–4 месяца, массой 22 г, срок гестации 14 дней. Получение клеточной культуры ММСК и ГСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. При этом мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной обработки ткани плаценты. Для подтверждения принадлежности культуры к ММСК производилась идентификация клеток с помощью набора антител Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit, содержащего позитивные (антитела к integrin  $\beta 1$ , CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45). Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95–97%. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 и CD 117. Проточная цитометрия была проведена на цитометре FACSCalibur. В суспензии трансплантируемых клеток оценивалось содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117, Sca-1 и отрицательных по Lin- (CD45, C3e, Ly-6G, M1/70, Ter-119). В качестве изотипического контроля для антител при проведении позитивной иммуномагнитной сепарации по SCA-1 и CD117 были использованы антитела PE labeled Rat IgG2a, kappa isotype control. С целью определения Lin антигенов на поверхности клеток был использован набор антител — FITC anti-mouse Lineage Cocktail with isotype control. Проведенные исследования позволили установить, что содержание клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 70-93%.

Изучалось воздействие ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр на лабораторных животных зрелого возраста, были выделены опытная и контрольная подгруппы. Контрольную группу составили животные, не подвергшиеся облучению. Животным опытной подгруппы внутривенно вводилась суспензия ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. кл./кг и 330 тыс. кл./кг, контрольной подгруппе вводили 0,9 % раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после облучения однократно. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения. Оценка регенераторных процессов в красной и белой пульпе селезенки производилась по определению основных морфометрических показателей органа: площадь лимфоидного фолликула = суммарная площадь лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов; площадь В-зоны лимфоидного фолликула = суммарная площадь В-зоны лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов; площадь герминативного центра лимфоидного фолликула = суммарная площадь герминативных центров лимфоидных фолликулов/количество лим-

фоидных фолликулов; площадь Т-зоны лимфоидного фолликула = суммарная площадь Т-зоны лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов; расстояние между центрами фолликулов = сумма расстояний между ближайшими фолликулами / количество подсчитанных расстояний. Клеточность красной пульпы определялось как среднее содержание клеток в красной пульпе в 0,01 мм<sup>2</sup>.

### Результаты

В физиологических условиях на 1 и 7 сутки после сочетанной трансплантации стволовых клеток изучаемые показатели достоверно не отличались от контроля.

На 1 сутки после воздействия ИИ на фоне введения ММСК и ГСК обнаружено увеличение клеточности красной пульпы по сравнению с контрольной подгруппой.

При проведении морфометрических исследований в селезенке на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне

сочетанной трансплантации стволовых клеток установлено увеличение площади лимфоидного фолликула на 14,6 % по сравнению с контролем. При этом данный показатель восстановился до значений нормы. Обнаружено увеличение площади В-зоны фолликула после введения клеток на 22,1 %, тогда как при анализе площади Т-зоны в опытной подгруппе выявлено отсутствие эффекта от трансплантации стволовых клеток. Кроме того, установлено увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов на 11 %, увеличение плотности клеток красной пульпы на 19 %, увеличение содержания эритроидных элементов в красной пульпе относительно контрольной подгруппы на 24,6 %. Однако этого было недостаточно для восстановления содержания эритроцитов в красной пульпе до значений нормы. Отмечено также увеличение содержания клеток белой крови в красной пульпе на 33 % по сравнению с контрольной подгруппой (таблица 1).

Таблица 1  
Морфометрические параметры селезенки мышей, М±m, n = 9

Tabl 1  
Morphometric parameters of the spleen of mice, M±m, n = 9

Параметры/ parameters	1 сутки после воздействия ИИ/1 day after exposure to IR		7 сутки после воздействия ИИ/1 day after exposure to IR	
	Введение 0,9% NaCl/ injection of 0,9% NaCl	Сочетанная трансплантация ММСК И ГСК/ Combined transplantation MSC and HSC	Введение 0,9% NaCl/ injection of 0,9% NaCl	Сочетанная трансплантация ММСК И ГСК/ Combined transplantation MSC and HSC
Площадь лимфоидного фолликула, (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )/ The area of the lymphoid follicle (μm <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	0,71±0,04*	0,71±0,03*	0,89±0,08*	1,02±0,07**
Площадь В-зоны (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )/ The area of B-zone (μm <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	0,70±0,03*	0,72±0,054*	0,79±0,08*	0,97±0,074**
Площадь Т-зоны (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )/ The area of T-zone (μm <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	0,067±0,006*	0,063±0,01*	0,07±0,07*	0,067±0,0079*
Расстояние между центрами фолликулов, мкм/ The distance between the centers of the follicles, μm	279,43±11,80*	275,14±10,16*	304,57±10,33	338,00±6,86* **
Общая клеточность красной пульпы в 0,01мм <sup>2</sup> / The total cellularity of the red pulp in 0.01 mm <sup>2</sup>	175,43±8,20*	200,29±7,76* **	186,71±5,47*	224,57±6,65* **
Содержание эритроцитов в красной пульпе в 0,01 мм <sup>2</sup> / The content of erythrocytes in the red pulp of 0.01 mm <sup>2</sup>	102,14±9,88*	110,14±9,02*	105,43±7,06*	131,71±5,76* **
Содержание лейкоцитов в красной пульпе в 0,01 мм <sup>2</sup> / The content of leukocytes in the red pulp of 0.01 mm <sup>2</sup>	69,29±5,18*	75,43±5,10*	76,00±6,57*	94,71±5,39* **

Примечание: \* отличие от группы интактных животных (контрольная группа), достоверно с p<0,05. \*\* отличие от подгруппы интактных животных после острой кровопотери (контрольная подгруппа), достоверно с p<0,05.

Note: in contrast to the group of intact animals (control group), significantly with p<0.05. \*\* difference between subgroups of intact animals after acute blood loss (control subgroup), significantly with p<0.05.

**Выводы**

Таким образом, проведенные исследования по изучению действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявили наличие определенных изменений в селезенке. Эти изменения были выражены в увеличении размеров лимфоидного фолликула за счет увеличения площади В-зоны фолликула. Однако, в изучаемые сроки еще не происходит восстановления данных показателей до значений нормы. На фоне трансплантации стволовых клеток в условиях воздействия ИИ происходит увеличение плотности клеток в красной пульпе селезенки и, как следствие, увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. В свою очередь, увеличение плотности клеток происходит как за счет увеличения содержания эритроцитов, так и за счет увеличения содержания лейкоцитов.

Выявленные изменения могут быть обусловлены способностью ММСК вырабатывать антиапоптозные факторы (HIF-1 $\alpha$ ), а также стимулировать экспрессию этих факторов другими клетками. Другой механизм действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК может быть обусловлен стимулирующим действием на гемопоэз в миелоидной ткани. Способность ММСК к выработке хемоаттрактанта для аллогенных и аутологичных ГСК (SDF-1) может усиливать миграцию последних в селезенку и индуцировать, таким образом, формирование различных типов колоний. Восстановление содержания клеточного состава крови и последующая миграция этих элементов в селезенку может способствовать восстановлению клеточного состава органа.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Сазонов С.В. Т-лимфоциты – регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор). Вестник Уральской медицинской академической науки. 2007. № 1. С. 91.
2. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Стволовые клетки, их свойства, источники получения и роль в регенеративной медицине. Екатеринбург: УГМУ 2016. 272 с.
3. Caplan A.I. Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell Biochem. 2006; 98:1076-84.
4. Маклакова И.Ю., Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю. Изменение морфометрических и цитологических показателей селезенки при острой кровопотере на фоне введения стволовых клеток. Успехи Геронтологии. 2015. Т.28, № 2. С. 218–221.
5. Alvares-Silva M. Mouse placenta is a major hematopoietic organ / M. Alvares-Silva, P. Belo – Diabangouaya, J. Salaun, F. Dieterlen –Lievre // Developmental Cell. – 2003. – P.5437 – 5444.
6. Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П., Маклакова И.Ю. Изменение морфометрических показателей селезенки старых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения на фоне трансплантации стволовых клеток. Казанский медицинский журнал. 2013. Т. 94. № 6: С. 911-914.
7. Шахпазьян Н.К. Сравнение биологических свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и плаценты для клинического применения / Н.К. Шахпазьян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева, А.Е. Гомзяков, Н.А. Новоселова, Я.А. Круглова, Е.В. Боякова, Б.Л. Лазебник, О.В. Князев, Е.В. Скоробогатова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 2. – С.53-54.
8. Pilz, G.A. Human term placenta – derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow – derived mesenchymal stromal cells / G.A. Pilz, C. Ulrich, M. Ruh // Stem Cells and Development. – 2011. – Vol. 20, № 4. – P.635 – 646.

**REFERENCES**

1. Sazonov S.V. T-lymphocytes - regulators of cell proliferation in tissue (scientific review). Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2007. No. 1. p. 91 (In Russ)
2. Jastrebov A.P., Grebnev D.Ju., Maklakova I.Ju. Stvolovye kletki, ih svojstva, istochniki poluchenija i rol' v regenerativnoj medicine. Ekaterinburg: UGMU 2016. 272 p. (In Russ)
3. Caplan A.I. Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell Biochem. 2006; 98:1076-84.
4. Maklakova I. Yu., Yastrebov A. P., Grebnev D. Yu. Changing of the morphometric and cytological indexes of the spleen in the condition of acute blood loss on the background of stem cells insertion. Advances in Gerontology = Uspehi Gerontologii. 2015. V.28, no. 2. pp. 218–221. (In Russ)
5. Alvares-Silva M. Mouse placenta is a major hematopoietic organ . M. Alvares-Silva, P. Belo – Diabangouaya, J. Salaun, F. Dieterlen–Lievre . Developmental Cell. 2003. pp. 5437–5444.
6. Grebnev D.Y., Yastrebov A.P., Maklakova I.Y. The change of splenic morphometric parameters in aged laboratory animals exposed to ionizing radiation after undergoing stem cells transplantation. Kazan Medical Journal = Kazanskij medicinskij zhurnal. 2013. V. 94. №6: pp. 911-914. (In Russ)
7. Shahpazjan N.K. Sravnenie biologicheskikh svojstv mul'tipotentnyh mezenhimal'nyh stromal'nyh kletok kostnogo mozga i placenty dlja klinicheskogo primeneniya . N.K. Shahpazjan, T.A. Astrelina, M.V. Jakovleva, A.E. Gomzjakov, N.A. Novoselova, Ja.A. Kruglova, E.V. Bojakova, B.L. Lazebnik, O.V. Knjazev, E.V. Skorobogatova. Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija. 2012. V.7, No. 2. pp. 53-54. (in Russ)
8. Pilz, G.A. Human term placenta – derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow – derived mesenchymal stromal

cells. G.A. Pilz, C. Ulrich, M. Ruh . Stem Cells and Development. 2011. Vol. 20, No. 4. pp. 635–646.

**Авторы**

Гребнев Дмитрий Юрьевич

Уральский государственный медицинский университет

Д.м.н., доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

Старший научный сотрудник

Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

dr-grebnev77@mail.ru

Маклакова Ирина Юрьевна

Уральский государственный медицинский университет

К.м.н., доцент кафедры патологической физиологии

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий

Старший научный сотрудник

Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

makliu@mail.ru

Осипенко Артур Васильевич

Уральский государственный медицинский университет

Д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии

Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

dr-grebnev77@mail.ru

**Authors**

Dmitriy Yu. Grebnev

Ural State Medical University

Dr.Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Pathological physiology Department

Institute of Medical Cell Technologies

Senior Researcher

str. Repin 3, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation

dr-grebnev77@mail.ru

Irina Yu. Maklakova

Ural State Medical University

Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Pathological physiology

Institute of Medical Cell Technologies

Senior Researcher

str. Repin 3, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation

makliu@mail.ru

Arthur V. Osipenko

Ural State Medical University

Dr.Sci.(Med.), Professor, Department of Pathological physiology

str. Repin 3, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation

dr-grebnev77@mail.ru