

Влияние препарата «Граноцит» на мезенхимальные стволовые клетки костного мозга при моделировании вторичного иммунодефицита с помощью циклофосфана в эксперименте

Байков А.Н.¹, Шахов В.П.², Шелгаев Н.Ю.³, Серебрякова В.А.¹

Effect of Granotsit preparation on mesenchymal bone marrow stem cells in experimental model of secondary immune deficiency with the aid of cyclophosphan

Baikov A.N., Shakhov V.P., Shelgaev N. Yu., Serebryakova V.A.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Медицинская промышленная компания «Электронпульс», г. Томск

³ Челябинский областной кожно-венерологический диспансер, г. Челябинск

© Байков А.Н., Шахов В.П., Шелгаев Н.Ю., Серебрякова В.А.

Проведены опыты на 60 мышах линии Balb/c обоего пола массой 18–21 г. Все манипуляции, эвтаназия (эфиром) осуществлялись в рамках утвержденных правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Мышей распределили на четыре группы по 15 животных. В первой серии осуществляли введение физиологического раствора, во второй – циклофосфана, в третьей – препарата «Граноцит» (рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), в четвертой – циклофосфана и препарата «Граноцит». Исследовали общее количество лейкоцитов в крови, клеточность костного мозга, содержания гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих клеток и мезенхимальных прекурсоров с помощью культуры ткани *in vitro*. Установлено, что препарат «Граноцит» обладает способностью стимулировать миелопоэз (прямое специфическое действие) и мезенхимопоэз (непрямое, опосредованное действие) в норме. При введении цитостатика исследуемый цитокин оказывает протекторное действие по отношению как к миелоидным, так и мезенхимальным прекурсорам костного мозга.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, мезенхимопоэз, иммунодефициты, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

Experiments with 60 male and female mice of Balb/c line with mass of 18–21 g have been carried out. All manipulations, including ether euthanasia, were performed within the framework of approved rules for experiments with experimental animals. The mice were divided into four groups each of 15 animals. The groups were injected with physiological salt solution (first group), cyclophosphan (second group), Granotsit preparation (recombinant granulocytic colony-stimulating factor) (third group), and cyclophosphan in Granotsit preparation (fourth group). We have studied the total number of leucocytes in blood, bone marrow cellularity, content of granulocytic-macrophage colony-forming cells and mesenchymal precursors with the aid of tissue culture *in vitro*. It has been found that the Granotsit preparation can stimulate myelopoiesis (direct specific action) and mesenchymopoiesis (indirect action) in norm. When a cytostatic agent, the studied cytokine has a protective action on both myeloid and mesenchymal precursors of bone marrow.

Key words: mesenchymal stem cells, mesenchymopoiesis, immune deficiency, granulocytic colony-stimulating factor.

УДК 616.419013.395:615.37:616.15].08

Введение

Вторичные иммунодефициты (ВИД) у детей и взрослых встречаются гораздо чаще, чем первичные. Патогенез ВИД сложен и разнообразен, они могут вызываться различными факторами: вирусными и бактериальными инфекциями, влиянием цитостатиков, гормонов, действием ионизирующей радиации, стресса, злокачественными новообразованиями,

патологией обмена веществ, беременностью и т.п. [1, 4, 9]. Часто мишенью выступают плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки (ПГСК), из которых образуются как миелоидные, эритроидные, мегакариоцитарные, так и лимфоидные элементы [7]. Процессы пролиферации и дифференцировки ПГСК контролируются гемопоэз-индуцирующим микроокружением (ГИМ) [6, 7]. В построении ГИМ

большую роль играют мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [7, 11]. Поражение МСК приводит к поломке структуры и функции ГИМ. В результате этого процесса может произойти нарушение продукции как лимфоидных, так и миелоидных клеток с последующим развитием ВИД.

В настоящее время практически отсутствуют патогенетически обоснованные методы коррекции повреждений со стороны МСК и ГИМ. В связи с этим большой интерес представляют работы, связанные с использованием цитокинов, в частности гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ), при лечении миелодепрессорных состояний, вызванных облучением, действием цитостатиков при лечении онкологических заболеваний [3, 12]. Однако большинство исследований направлено на изучение протекторного действия ГКСФ на стволовые клетки белого ростка крови. В них не определяли способность данного цитокина регулировать морфофункциональные свойства МСК. О потенциальной возможности действия ГКСФ на мезенхимальные стволовые клетки свидетельствует тот факт, что его введение приводит к мобилизации МСК из костного мозга в кровь [3]. Тем не менее вопрос о том, обладает ли данный фактор способностью активировать МСК костного мозга при развитии ВИД, остается открытым.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение изменений, происходящих со стороны пула МСК костного мозга при моделировании вторичных иммунодефицитных состояний с помощью цитостатика — циклофосфана.

Материалы методы

Опыты были проведены на 60 мышах линии Balb/c обоего пола массой 18–21 г в осенне-зимний период, в утренние часы для уменьшения влияния суточных и сезонных колебаний. Перед началом исследований все животные проходили 2-недельный карантин. Содержание мышей, все манипуляции, эвтаназия (эфиром) осуществлялись в рамках утвержденных правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Животных распределяли по следующим сериям: 1-я группа (контрольная) — мыши, получавшие в течение 4 сут физиологический раствор (15 животных); 2-я — животные, которым подкожно вводили препарат «Граноцит» («Aventis Pharma Specialites for Nycomed», Франция) (рекомбинантный человеческий ГКСФ) в дозе 10 мкг/кг массы тела в течение 4 сут (15 особей); 3-я — мыши с ВИД, вызванным однократным внутрибрюшинным введением циклофосфана (ОАО «Биохимик», Россия) в дозе 100 мкг/кг массы тела (15 животных); 4-я — животные, получившие однократную интраперитонеальную

инъекцию циклофосфана в дозе 100 мкг/кг массы тела с последующим подкожным введением препарата «Граноцит» в дозе 10 мкг/кг массы тела в течение 4 сут (15 мышей). На каждую точку приходилось по 3 животных в каждой серии экспериментов.

Дозы циклофосфана (ЦФ) и граноцита были подобраны на основании предварительных исследований и данных литературы [3, 7].

Общее количество лейкоцитов в периферической крови и клеточность костного мозга определяли по описанному Е. Д. Гольдбергом и соавт. меланжерному методу в камере Горяева [2].

Жизнеспособность клеток исследовали с помощью метода включения в клетки 0,1%-го раствора трипанового синего на 200 кардиоцитах в камере Горяева («Sigma», США) [2].

Культивирование гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (ГМКОЕ) (клеток предшественников миелопоэза) производили по методу T.R. Bradley, D. Metcalf [10] в модификации В. П. Шахова и соавт. [8]. Клетки костного мозга вымывали из бедренной кости 1–2 мл среды McCoy's 5A («Sigma», США) в асептических условиях. Материал ресуспендировали и осторожно насплавляли на 3 мл раствора гистопака («Sigma») ($\rho = 1,077$ г/мл), налитого в стерильную центрифужную пробирку. Клетки подвергали градиентному центрифугированию при 1500 об/мин в течение 30 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо, состоящее из мононуклеаров, собирали и еще два раза центрифугировали в среде McCoy's 5A для очистки от гистопака. Количество жизнеспособных клеток доводили до $5 \cdot 10^5$ /мл в полной питательной среде, содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Sigma»), 78,7% среды D1-MEM, 1% $100\times$ раствора пенициллина, стрептомицина и L-глутамина («Sigma»), $5 \cdot 10^{-5}$ моль 2-меркаптоэтанола («Merck», Германия), 10 мкг/л рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (препарат «Граноцит»). Затем добавляли 0,3%-й раствор бактоагара («Difco», США), охлажденный до 40 °С. Материал быстро перемешивали и разливали в 12-луночные плоскодонные планшеты фирмы «Costar» по 0,5 мл. После гелификации агара в каждую ячейку добавляли 0,5 мл полной среды. Затем планшеты помещали в CO_2 -инкубатор (CO_2 5%, 37 °С, влажность 100%). Через 6–7 сут материалы извлекали с помощью инвертооскопа «Opton» (Германия) и подсчитывали число образовавшихся ГМКОЕ, клеточных агрегатов, содержащих более 50 кардиоцитов. В контрольной серии ГКСФ в культуру не добавляли.

Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга исследовали по методу А.Я. Фриденштейна и Е.А. Лурия [6, 8] с некоторыми модификациями. Так, 1 мл полной питательной среды с помощью шприца из бедренной кости вымывали клетки костного мозга, ресуспендировали на льду. Полная питательная среда содержала 10% ЭТС («Sigma»), 90% среды D-MEM с низким содержанием глюкозы, 200 ммоль/л -глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все реактивы фирмы «Sigma»). Конечную концентрацию жизнеспособных кариоцитов доводили до $1 \cdot 10^6$ /мл, разливали в культуральные флаконы фирмы «Falcon» по 5 мл и помещали в CO_2 -инкубатор (CO_2 5%, 37 °C, влажность 100%). Через 3 сут неадгезирующие клетки удаляли и заменяли 5 мл полной культуральной среды новой порцией. Спустя еще 5 сут про-

изводили смену культуральной среды. На 12—14-е сут подсчитывали число образовавшихся клонов — клеточных агрегатов, содержащих более 50 клеток. Часть материала окрашивали после фиксации метанолом азур-эозином для определения морфологии клеток (Новицкий В.В. и соавт., 2004). Для изучения прямого действия Г-КСФ на МСК в полную культуральную среду на 3-и сут после удаления неадгезирующих клеток добавляли препарат «Граноцит» в дозах 0, 50, 100, 150, 200 мкг/л.

Статистическую обработку осуществляли с помощью критерия Манна—Уитни, определяли выборочное среднее значение $\bar{X}$, ошибку среднего m , уровень значимости p , используя программу Statistica 6.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что введение циклофосфана приводит к угнетению миело- и мезенхимопоэза, снижению общего количества миелокариоцитов, ГМКОЕ и МСК в костном мозге и развитию лейкопении в периферической крови. Эти факты свидетельствуют о том, что под действием цитостатика у животных формируется вторичный иммунодефицит (табл. 1, 2).

Введение Г-КСФ в течение 4 сут сопровождается выраженной стимуляцией белого ростка крови как на уровне гранулоцитарно-макрофагальных прекурсоров, так и кариоцитов в костном мозге и периферической крови, что согласуется с данными других авторов [3, 12].

Таблица 1

Содержание лейкоцитов в периферической крови, ОКК, ГМКОЕ и МСК в костном мозге мышей линии Balb/c после введения препарата «Граноцит» (Г-КСФ), циклофосфана, циклофосфана и препарата «Граноцит» ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Контрольная группа животных без применения Г-КСФ	1-е сут	4-е сут	6-е сут	10-е сут	14-е сут
Лейкоциты, $\cdot 10^9$ /л:						
Г-КСФ	12,81 $\pm$ 0,30	12,73 $\pm$ 0,20	15,85 $\pm$ 0,41*	20,17 $\pm$ 0,45*	16,15 $\pm$ 1,14*	11,90 $\pm$ 1,60
ЦФ	12,81 $\pm$ 0,30	7,79 $\pm$ 0,33	3,57 $\pm$ 0,21*	6,00 $\pm$ 0,43*	7,63 $\pm$ 0,23*	10,88 $\pm$ 0,91
Г-КСФ и ЦФ	12,81 $\pm$ 0,30	5,55 $\pm$ 1,91*	15,83 $\pm$ 0,45*	10,59 $\pm$ 1,35	11,27 $\pm$ 0,75	11,10 $\pm$ 0,71
ОКК, $\cdot 10^6$:						
на бедро+ Г-КСФ	19,53 $\pm$ 0,51	19,77 $\pm$ 0,35	22,65 $\pm$ 0,33*	24,00 $\pm$ 1,22*	23,91 $\pm$ 0,53*	21,10 $\pm$ 1,00
на бедро+ ЦФ	19,53 $\pm$ 0,51	4,12 $\pm$ 0,33*	6,00 $\pm$ 0,44*	6,83 $\pm$ 0,59*	10,11 $\pm$ 0,63*	15,30 $\pm$ 2,50
на бедро+ Г-КСФ+ ЦФ	19,53 $\pm$ 0,51	10,92 $\pm$ 0,33*	15,57 $\pm$ 3,95	17,17 $\pm$ 0,75	16,93 $\pm$ 2,15	18,30 $\pm$ 0,71
ГМКОЕ, $\cdot 10^5$:						
на бедро+ Г-КСФ	35,11 $\pm$ 2,62	39,18 $\pm$ 3,35	65,89 $\pm$ 2,93*	46,25 $\pm$ 2,53*	34,81 $\pm$ 1,75	36,73 $\pm$ 2,21
на бедро+ ЦФ	35,15 $\pm$ 2,68	11,19 $\pm$ 3,15*	16,37 $\pm$ 2,69*	17,93 $\pm$ 1,85*	27,53 $\pm$ 5,93	30,31 $\pm$ 1,41
на бедро+ Г-КСФ+ ЦФ	35,15 $\pm$ 2,60	13,77 $\pm$ 3,63*	27,95 $\pm$ 3,05	31,57 $\pm$ 1,14	30,33 $\pm$ 2,79	37,90 $\pm$ 3,30
МСК, $\cdot 10^6$:						
на бедро+ Г-КСФ	11,44 $\pm$ 0,65	9,93 $\pm$ 1,57	14,35 $\pm$ 0,37*	15,15 $\pm$ 0,59*	13,35 $\pm$ 1,37	12,91 $\pm$ 0,31
на бедро+ ЦФ	11,45 $\pm$ 0,68	10,81 $\pm$ 0,55	9,74 $\pm$ 0,50*	7,83 $\pm$ 0,41*	9,40 $\pm$ 0,53*	10,71 $\pm$ 0,50
на бедро+ Г-КСФ+ ЦФ	11,41 $\pm$ 0,61	9,59 $\pm$ 0,37	8,40 $\pm$ 2,46	10,68 $\pm$ 0,93	12,00 $\pm$ 0,69	10,50 $\pm$ 0,31

* $p < 0,05$.

Таблица 2

Количество колоний, выросших из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга интактных мышей линии Balb/c при добавлении к культуре *in vitro* препарата «Граноцит» (Г-КСФ) ($X \pm m$)

Граноцит, мкг/мл	МСК	p_i
0	11,41 $\pm$ 0,61	
50	10,93 $\pm$ 0,69	<0,05
100	12,17 $\pm$ 0,75	<0,05
150	10,85 $\pm$ 0,89	<0,05
200	11,53 $\pm$ 0,75	<0,05

Примечание. p_i определяли по отношению к культуре МСК без добавления препарата «Граноцит».

Интересно, что данный цитокин оказывает влияние не только на костномозговой пул миелоидных клеток предшественников, но и мезенхимальные стволовые клетки, для которых, согласно общепринятым взглядам, он не является специфическим цитокином (см. табл. 1) [7, 8].

При этом установлено, что Г-КСФ оказывает свое стимулирующее влияние на мезенхимопоэз не прямо, а опосредованно, так как добавление его непосредственно в культуру ткани *in vitro* приводит к усилению роста мезенхимальных колоний (табл. 2). Возможно, что данный эффект связан с тем, что часть МСК при введении Г-КСФ покидает костный мозг [3]. При этом образовавшиеся свободные «ниши» для мезенхимальных стволовых клеток через цитокиновую сеть, интегрины, адгезины, элементы экстрацеллюлярного матрикса и другие факторы стимулируют образование новых МСК. Не исключено, что в данном процессе могут принимать участие и другие механизмы, например аутокринные и (или) паракринные [3, 5].

Обнаружено, что препарат «Граноцит» обладает способностью не только корригировать нарушения со стороны лейкопоэза при моделировании ВИД с помощью циклофосфана, но и нормализовать уровень ГМКОЕ и МСК в костном мозге начиная с 4-х сут опыта (см. табл. 1). В свою очередь, репарация поврежденных МСК может сопровождаться реконструкцией гемопоэз индуцирующего микроокружения, которое, как известно, страдает при действии цитостатиков [6, 7]. Восстановление ГИМ, очевидно, должно

способствовать регенерации ГМКОЕ через элементы экстрацеллюлярного матрикса костного мозга.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что препарат «Граноцит» (рекомбинантный Г-КСФ) обладает способностью стимулировать миелопоэз (прямое специфическое действие) и мезенхимопоэз (непрямое, опосредованное действие) у здоровых животных. При введении цитостатика Г-КСФ оказывает протекторное действие как на миелоидные, так и мезенхимальные клетки предшественники костного мозга.

Литература

1. Волков А. Г., Трофименко С. Л. Клинические проявления вторичного иммунодефицита при заболеваниях ЛОР-органов: Руководство для врачей. Элиста: Джангар, 2007. 176 с.
2. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П. Методы культуры тканей в гематологии. Томск: ТГУ, 1992.
3. Козлов В. А. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор: физиологическая активность, патофизиологические и терапевтические проблемы // Цитокины и воспаление. 2004. Т. 3. № 2. С. 3—15.
4. Машковский М. Д. Лекарственные средства. Минск: Беларусь, 1987. Т. 2. С. 384—387.
5. Симбирцева А. С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. 2004. Т. 3. № 2. С. 16—22.
6. Фриденштейн А. Я., Лурие Е. А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М.: Медицина, 1980. 213 с.
7. Черток И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М.: Медицина, 1977. 272 с.
8. Шахов В. П., Хлусов И. А., Дамбаев Г. Ц. и др. Введение в методы культуры клеток, биоинженерию органов и тканей / Отв. ред. В. В. Новицкий. Томск: STT, 2004. 386 с.
9. Ширинский В. С., Старостина Н. М., Сенникова Ю. А., Малышева О. А. Проблемы диагностики и классификации вторичных иммунодефицитов // Аллергология и иммунология. 2000. Т. 1. № 1. С. 62—70.
10. Bradley T. R., Metcalf D. // J. Exp. Biol. Med. Sci. 1966. V. 44. P. 287—300.
11. Conget P., Gordon S. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // J. Cell. Physiol. 1999. № 181. P. 67—73.
12. Metcalf D. The hemopoietic colony stimulating factors. Amsterdam, Elsevier. 1977. 420 p.

Поступила в редакцию 19.06.2007 г.

Сведения об авторах

А. Н. Байков — д-р мед. наук, профессор, директор ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

В. П. Шахов — д-р мед. наук, профессор, медицинская промышленная компания «Электропульс» (г. Томск).

Н. Ю. Шелгаев — врач, Челябинский областной кожно-венерологический диспансер (г. Челябинск).

В. А. Серебрякова — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Байков Александр Николаевич тел. (3822) 52-73-99.