

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ-ДОНОРОВ, НЕСУЩИХ ГЕН *egfp*, У ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ

© 2018 г. Л.А. Сергиевич, Е.В. Карнаухова, А.В. Карнаухов, Н.А. Карнаухова, Е.В. Богданенко*, И.А. Лизунова, В.Н. Карнаухов

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3

**Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, Балтийская ул., 8*

E-mail: larserg@mail.ru

Поступила в редакцию 05.10.17 г.

После доработки 01.12.17 г.

Проведено исследование регенеративного потенциала клеток костного мозга мышей-доноров, экспрессирующих улучшенный зеленый флуоресцентный белок, у облученных в дозе 7 Гр мышей. Экспрессия этого белка дала возможность провести пожизненный мониторинг присутствия клеток донора в крови реципиента. После трансплантации продолжительность жизни молодых реципиентов увеличилась на 93%, старых – на 15%. Показано тотальное пожизненное заселение костного мозга, селезенки, тимуса и крови реципиента клетками донорского костного мозга. При исследованной дозе облучения и количестве трансплантированных клеток $(11,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$ на поверхности селезенки выявлены только колонии донора. Процент клеток костного мозга и селезенки, экспрессирующих маркеры стволовых клеток CD117 и CD34 у мышей-реципиентов, оставался выше контрольного уровня длительное время после облучения. Более половины клеток с фенотипами CD117, CD34, CD90.2 и CD45R/B220 в исследованных органах были клетками донора. Дальнейшее детальное изучение особенностей приживаемости клеток костного мозга как без предварительной обработки реципиентов, так и после воздействия экстремальных факторов позволит совершенствовать методики клеточной терапии.

Ключевые слова: трансплантация, костный мозг, облучение, продление жизни, GFP⁺-мышь, информационная гипотеза старения.

В середине XX века был разработан метод трансплантации костного мозга (КМ) больным с иммунодефицитами и гематологическими нарушениями [1,2]. Методики трансплантации КМ постоянно совершенствуются и применяются для лечения как онкологических больных, так и больных с апластической анемией, тяжелыми наследственными заболеваниями крови, врожденными иммунодефицитами. При этом в зависимости от показаний проводится аллогенная, сингенная или ауто трансплантация цельной фракции КМ [3–6].

Кроме того, в некоторых случаях при аллогенной трансплантации используются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки КМ, которые не содержат рецепторов главного комплекса гистосовместности второго

типа, что позволяет применять их как для поддержания микроокружения гематopoэтических стволовых клеток, так и для иммуномодулирующего действия в реакции «трансплантат против хозяина» [7]. Также мезенхимальные стромальные клетки в медицинской практике используются для лечения апластической анемии [8] и восстановления костной ткани путем ауто трансплантации [9].

Однако в широкую медицинскую практику методики по использованию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пока еще не внедрены, а трансплантация цельной фракции клеток КМ в лечебных целях часто сопровождается развитием реакции «трансплантат против хозяина», которая в той или иной степени тяжести наблюдается приблизительно после 30–50% трансплантаций от родственных доноров и 80% от неродственных трансплантаций. Наиболее часто применяемой является ауто трансплантация (60% от всех трансплантаций КМ в США и Европе) [6].

Сокращения: КМ – костный мозг, EGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок, СПЖ – средняя продолжительность жизни, ГСК – гематopoэтические стволовые клетки, МСК – мезенхимальные стволовые клетки.

В настоящее время проводятся исследования возможности аутотрансплантации цельной фракции КМ в целях омоложения стареющего организма. В соответствии с предложенной нами информационной теорией старения [10] были проведены исследования в модельных экспериментах на инбредной линии мышей, в которых, несмотря на сравнительно короткий срок пребывания донорских клеток в организме реципиента (около двух недель), нам удалось зарегистрировать существенное увеличение (на 34%) продолжительности жизни экспериментальных животных по сравнению с контролем [11–13]. В экспериментах с использованием цитостатика 5-фторурацила при сингенной трансплантации КМ внутри той же линии мышей была подобрана неталетальная доза цитостатика и зарегистрирована приживаемость клеток КМ, экспрессирующих улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), вплоть до 21 суток после трансплантации [14].

Отметим, что для аутотрансплантации могут также быть использованы заранее криосохраненные пуповинная кровь и плацента. Исследование нами регенеративного потенциала клеток плаценты в модельных экспериментах на мышах выявило высокий потенциал именно материнской части плаценты [15].

С учетом вышесказанного остается актуальным детальное изучение приживаемости трансплантированных клеток КМ и выживаемости реципиентов как без предварительной их обработки, так и после воздействия экстремальных факторов, таких как облучение и цитостатики.

В наших экспериментах в качестве доноров использовали мышей C57BL/6 – Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J, содержащих в хромосоме 15 трансген *egfp*. EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein – улучшенный зеленый флуоресцентный белок) представляет собой естественную витальную метку и используется для прижизненного исследования индивидуальных клеток [16]. В экспериментах на трансгенных мышах было показано, что большинство лейкоцитов, включая В, Т, НК (натуральные киллеры), дендритные клетки, макрофаги и нейтрофилы, экспрессирует зеленый флуоресцентный белок. Экспрессия EGFP в этих клетках не влияет на их развитие, функции и дифференцировку. Показано отсутствие иммунологических отличий между мышами, несущими ген EGFP и разводимыми на основе инбредной линии C57BL/6, и мышами этой же линии, не имеющими трансгена, что позволяет использовать таких животных для мониторинга миграции клеток различных типов в организме ис-

следуемого животного после трансплантации КМ [17–19].

Целью настоящей работы явилось изучение регенеративного потенциала клеток КМ в модельных экспериментах на облученных мышах инбредной линии. В работе исследовали динамику заселения органов системы крови мышей-реципиентов клетками донора, экспрессирующими EGFP (GFP⁺-клетками), и определяли их фенотип с использованием CD-маркеров, изучали процесс образования колоний в селезенке, а также продолжительность жизни облученных животных после трансплантации КМ с мониторингом заселения GFP⁺-клетками организма реципиента по капле крови в разные сроки после облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В качестве доноров КМ использовали самок и самцов мышей, несущих ген EGFP (Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J), разводимых на основе инбредной линии C57BL/6 EGFP^{-/-}. Животные были получены при содействии А.М. Малашенко из Научного Центра биомедицинских технологий РАМН, куда они поступили из Jackson Laboratory (Bar Harbor, США) с любезного разрешения А.В. Червоного. Мышей содержали в виварии ИБК РАН по 1–3 мыши в клетке на рационе из гранулированного корма с дополнительной подкормкой зерносмесью, состоящей из пшеницы, ячменя, красного проса, семечек подсолнуха, кукурузы и травяных гранул. Трансген *egfp* в клетках донора (GFP⁺-мышь) использовали как метку для определения их приживаемости в организме не несущего этот трансген реципиента (GFP⁻-мышь). Использовали мышей двух возрастных групп – молодых доноров (3–5 месяцев) и старых доноров (10–12 месяцев).

В качестве реципиентов использовали разные возрастные группы GFP⁻-мышей в возрасте 4–12 месяцев. Мышей облучали с помощью источника рентгеновского облучения в дозе 7 Гр, после чего в экспериментальных группах мышей через сутки проводили трансплантацию КМ (внутривенно) от GFP⁺-доноров, с учетом совпадения пола донора и реципиента. Контролем служили облученные в той же дозе мыши, но без последующей трансплантации КМ (облученный контроль) и интактные мыши (интактный контроль).

Источник рентгеновского облучения. Облучение животных проводили сотрудники Группы источников излучений Института биофизики клетки РАН (г. Пущино, Московская область) на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 (РУМ

17), $I = 15$ мА, $U = 200$ кВ, с фильтрами из меди и алюминия, толщиной по 1 мм каждый, мощность излучения 1 Гр/мин.

Получение суспензии клеток костного мозга и их трансплантация. Мышей забивали дислокацией шейных позвонков. КМ выделяли из двух бедренных костей донора путем их измельчения в фарфоровой ступке с раствором фосфатно-солевого буфера (600 мкл) и последующей фильтрацией через капроновое сито с размером пор 70 мкм. Трансплантацию проводили в боковую вену предварительно разогретого при температуре 40–45°C хвоста реципиента с помощью инсулинового шприца в объеме 100 мкл цельной фракции КМ, содержащем $(11,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$ клеток, непосредственно после выделения. Общее количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева.

Выделение клеток костного мозга, селезенки и тимуса. Начиная с пятых суток после облучения, мышей забивали и извлекали тимус, селезенку и бедренную кость, помещали их в фосфатно-солевой буфер, после чего промывали и взвешивали. Тимус и селезенку протирали с помощью скальпеля через капроновый фильтр с размером пор 70 мкм с использованием фосфатно-солевого буфера в объеме 1 мл для тимуса и 2 мл для селезенки. Костный мозг выделяли из одной бедренной кости по методике, описанной выше.

Подсчет собственных колоний (эндоколоний) у облученных мышей проводили на диафрагмальной поверхности, а донорских колоний (экзоколоний) – как на диафрагмальной, так и висцеральной поверхностях целой селезенки.

Определение количества GFP⁺-клеток в органах реципиентов. По 10 мкл суспензии костного мозга, тимуса и селезенки помещали на предметные стекла, покрытые полилизинном (Thermo Scientific, Германия), и накрывали покровными стеклами 20 × 20 мм. Для определения процента GFP⁺-клеток фотографировали 10–20 полей зрения равномерно по всему препарату; одно и то же поле снимали дважды – в проходящем свете с использованием DIC (дифференциального интерференционного контраста) и в свете флуоресценции, после чего подсчитывали среднее количество всех ядерных клеток в поле зрения (клеточность) и процент флуоресцирующих клеток среди них.

При исследовании продолжительности жизни облученных животных после трансплантации КМ проводили мониторинг заселения его органов GFP⁺-клетками в разные сроки после облучения. Для этого небольшую каплю крови

из хвоста реципиента помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и проводили фотосъемку, как описано выше. На препаратах оценивали содержание флуоресцирующих лейкоцитов и тромбоцитов.

При освещении светом с длиной волны в диапазоне 395–475 нм GFP флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом флуоресценции на длине волны 508 нм. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axio-Imager Z1 с цветной цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия). Количество и интенсивность флуоресценции GFP⁺-клеток оценивали с помощью программы «Cell Analyzer-2» [20].

Иммунофлуоресценция. Экспрессию мембранных рецепторов на клетках КМ и селезенки анализировали с использованием моноклональных антител к CD117, CD34, CD90.2 (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США) и CD45R/B220 (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США), меченных фикоэритрином. Для этого клетки инкубировали в течение 1 ч при 4°C в темноте. Затем клетки промывали в фосфатно-солевом буфере и подсчитывали по методике, описанной выше для клеток КМ, селезенки и тимуса.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерного языка программирования МАТЕМАТИКА 5.2 и программы SigmaPlot 12.1. Доверительную вероятность P определяли стандартным образом с использованием критерия Стьюдента. Результаты представлены как $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка. Значения усредняли от трех–пяти животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для исследования средней продолжительности жизни (СПЖ) облученных мышей после трансплантации им КМ были сформированы три экспериментальных группы животных. Мышей облучали в дозе 7 Гр и через сутки трансплантировали КМ GFP⁺ доноров в количестве в среднем $(11,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$ клеток на одно животное. В первой группе проводили инъекции КМ молодым животным (3–5 месяцев) от молодых доноров (3–5 месяцев), во второй группе КМ молодых доноров вводили старым мышам (12 месяцев) и в третьей группе старым мышам вводили КМ от старых доноров (12 месяцев). Полученные результаты показаны в табл. 1 (эксперимент 1, 2 и 3 соответственно). Также были сформированы группы молодого и старого облученного контроля соответствующих эксперименту возрастов (табл. 1, облученный контроль). Кроме того, исследовали СПЖ мы-

Таблица 1. Средняя продолжительность жизни мышей в эксперименте с облучением и последующей трансплантацией КМ, в облученном и в интактном контроле

Группы мышей	Эксперимент 1 (молодые реципиенты, молодой КМ)		Эксперимент 2 (старые реципиенты, молодой КМ)		Эксперимент 3 (старые реципиенты, старый КМ)	
	СПЖ, сут	Δ	СПЖ, сут	Δ	СПЖ, сут	Δ
Эксперимент	350 ± 70 $N = 19$	$\Delta_{\text{пд}} = 367\%^*$ $P = 0,99$	480 ± 22 $N = 12$	$\Delta_{\text{пд}} = 98\%^*$ $P = 0,60$	469 ± 24 $N = 14$	$\Delta_{\text{пд}} = 85\%^*$ $P = 0,60$
Облученный контроль	181 ± 51 $N = 22$	$\Delta_{\text{ок}} = 93\%^*$ $P = 0,99$	419 ± 19 $N = 16$	$\Delta_{\text{ок}} = 15\%^*$ $P = 0,60$	419 ± 19 $N = 16$	$\Delta_{\text{ок}} = 12\%^*$ $P = 0,60$
Интактный контроль	517 ± 76 $N = 25$	$\Delta_{\text{ик}} = -32\%^*$ $P = 0,99$	551 ± 24 $N = 21$	$\Delta_{\text{ик}} = -13\%^*$ $P = 0,60$	551 ± 24 $N = 21$	$\Delta_{\text{ик}} = -15\%^*$ $P = 0,60$

Примечание. * – Различия достоверны по сравнению с контролем; $\Delta_{\text{пд}}$ – увеличение продолжительности дожития с начала эксперимента в сравнении с облученным контролем; $\Delta_{\text{ок}}$ – увеличение СПЖ в эксперименте в сравнении с облученным контролем; $\Delta_{\text{ик}}$ – увеличение СПЖ в эксперименте в сравнении с интактным контролем; N – количество мышей в экспериментах.

шей групп интактного контроля (табл. 1, интактный контроль). На рис. 1а в качестве примера представлен график выживаемости мышей группы 1 (зависимость 1) по сравнению с соответствующим облученным (зависимость 2) и интактным контролем (зависимость 3).

Было показано, что в эксперименте 1 с молодыми реципиентами и молодыми донорами (рис. 1, табл. 1) СПЖ реципиентов увеличилась на 93% по сравнению с облученным контролем, но была меньше на 32% по сравнению с интактным контролем. Продолжительность дожития с начала эксперимента (облучения и трансплантации КМ) увеличилась на 367% по сравнению с облученным контролем.

В эксперименте 2 со старыми реципиентами и молодыми донорами (табл. 1) СПЖ увеличилась на 15% по сравнению с облученным контролем, но была меньше на 13% по сравнению с интактным контролем. Продолжительность дожития с начала эксперимента увеличилась на 98% по сравнению с облученным контролем.

В эксперименте 3 со старыми реципиентами и КМ от старых доноров (табл. 1) СПЖ увеличилась на 12% по сравнению с облученным контролем, но была меньше на 15% по сравнению с интактным контролем. Продолжительность дожития с начала эксперимента увеличилась на 85% по сравнению с облученным контролем.

При этом СПЖ в эксперименте со старыми реципиентами выше, чем СПЖ в эксперименте с молодыми реципиентами, на 37% (350 ± 70 и 480 ± 44 сут соответственно, $P = 0,95$). Более высокую СПЖ у старых реципиентов, чем у молодых, можно объяснить существенной раз-

ницей в возрасте между ними в момент облучения и трансплантации КМ.

Начиная с пятых суток после облучения, раз в неделю в течение первого месяца и раз в две недели в дальнейшем, у мышей всех экспериментальных групп из хвостовой вены брали каплю крови для исследования наличия в ней донорских GFP⁺-клеток. Было обнаружено присутствие GFP⁺-лейкоцитов и GFP⁺-тромбоцитов в крови реципиентов. Однако следует отметить, что у единичных животных (менее 5%), близких к смерти, в крови отсутствовали GFP⁺-тромбоциты или их было очень мало. Таким образом, прижизненный мониторинг крови экспериментальных мышей позволил напрямую связать увеличение продолжительности жизни с присутствием в их организме донорских GFP⁺-клеток.

Для исследования регенеративного потенциала, а также распределения донорских GFP⁺-клеток в органах системы крови облученных в дозе 7 Гр мышей были проведены серии экспериментов по определению массы органов, а также клеточности (среднего количества всех ядерных клеток в поле зрения) и процента GFP⁺-клеток в КМ, селезенке и тимусе реципиентов. Также определяли интенсивность флуоресценции GFP⁺-клеток в КМ реципиента и сравнивали ее с клетками КМ GFP⁺-контроля.

Сразу после облучения как в контроле, так и в эксперименте происходит уменьшение массы селезенки и тимуса (рис. 2а,б). При этом в случае тимуса наблюдается его полная инволюция. Далее к концу периода наблюдения (35 дней после облучения) у трансплантированных животных происходит восстановление массы селезенки и тимуса, в то время как у облученного контроля тимус не восстанавливает-

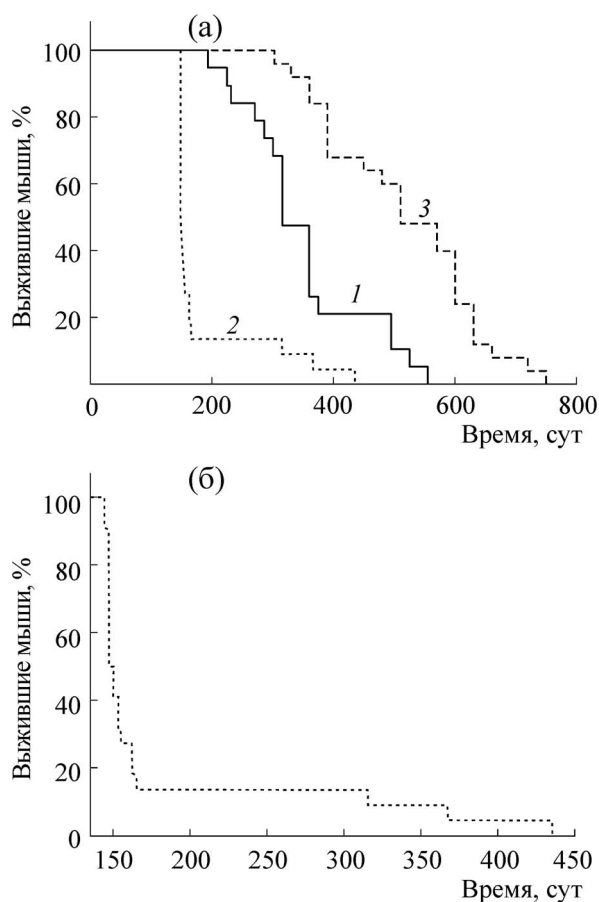


Рис. 1. Выживаемость мышей: (а) – в эксперименте с облучением и последующей трансплантацией КМ – зависимость 1 ($N = 19$), в облученном – зависимость 2 ($N = 22$) и интактном контроле – зависимость 3 ($N = 25$); (б) – облученный контроль в увеличенном масштабе ($N = 22$). Показаны данные эксперимента 1: молодые реципиенты и доноры КМ (возраст мышей – 4,5 мес.); N – количество мышей.

ся, а масса селезенки значительно превышает уровень интактного контроля.

Аналогичные изменения происходят и в клеточности исследуемых органов (рис. 3). В облученном контроле к концу исследуемого периода восстанавливается только селезенка, в то время как клеточность КМ и тимуса близка к нулю. В экспериментальной группе клеточность КМ и селезенки восстанавливается до контрольного уровня, а в тимусе значительно превышает таковой, что можно связать с несколько более поздним началом его заселения.

У используемых нами в качестве доноров мышей количество GFP^+ -клеток в КМ в среднем составляет $46,1 \pm 5,1\%$, в селезенке – $50,8 \pm 4,8\%$, а в тимусе – $9,5 \pm 1,0\%$. В экспериментальной группе мышей с облучением и последующей трансплантацией КМ уже на пятые

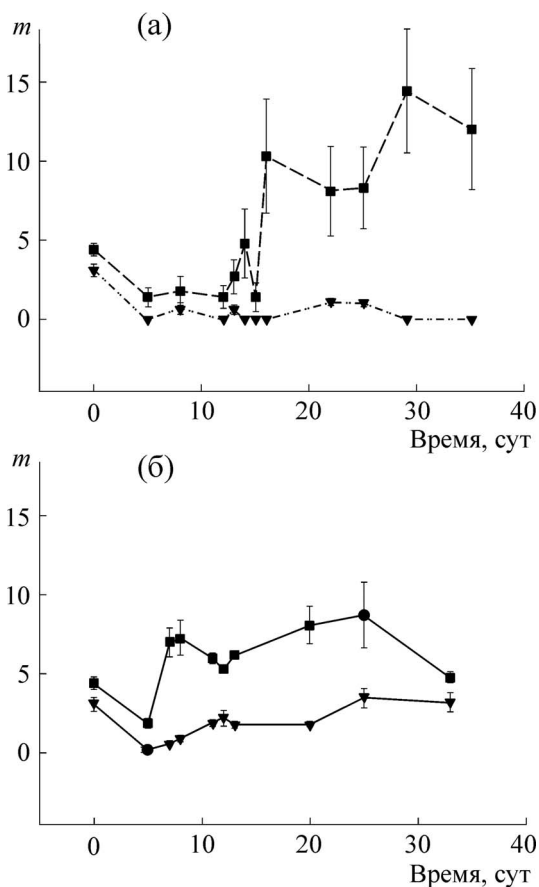


Рис. 2. Изменение массы селезенки (квадраты) и тимуса (треугольники) в облученном контроле (а) и в эксперименте с облучением и последующей трансплантацией КМ (б) в течение 35 сут после облучения.

сутки после облучения донорские GFP^+ -клетки обнаруживаются в КМ и селезенке реципиентов. На седьмые сутки после облучения в КМ реципиентов регистрируется $26,7 \pm 9,3\%$, а в селезенке – $6,5 \pm 1,6\%$ GFP^+ -клеток (рис. 4а). Такая разница в процентном количестве донорских клеток в КМ и селезенке реципиентов объясняется более значительным опустошением их КМ после облучения (рис. 4б). На двенадцатые сутки после облучения количество GFP^+ -клеток в КМ и селезенке реципиентов приближается к таковому у интактного GFP^+ -контроля и составляет $43,2 \pm 4,5$ и $40,2 \pm 3,2\%$ соответственно. Далее до конца исследуемого периода количество GFP^+ -клеток в этих органах остается высоким, хотя и наблюдаются некоторые колебания их количества.

В тимусе реципиентов (рис. 4а) заметное количество GFP^+ -клеток ($4,2 \pm 0,8\%$) обнаруживается только на 26-е сутки после облучения. В это время происходит и значительное увели-

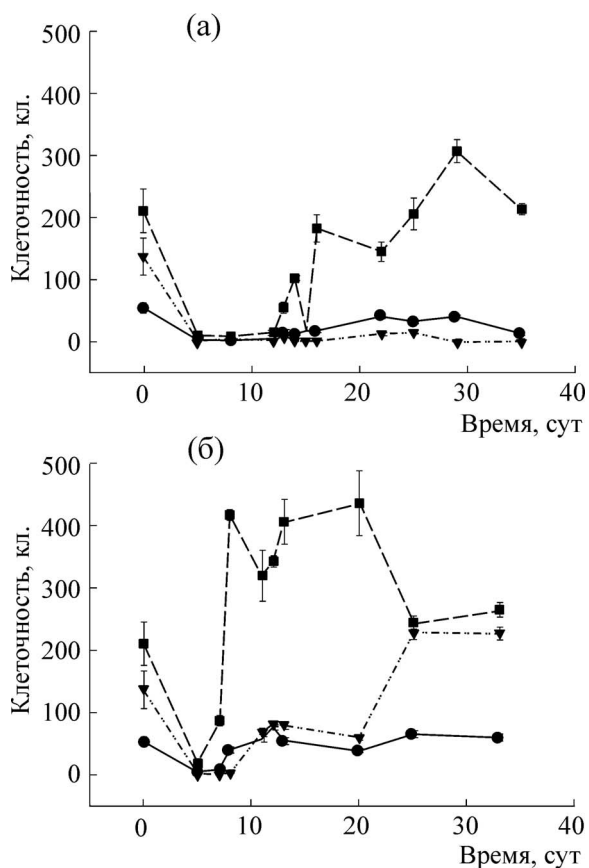


Рис. 3. Изменение среднего количества ядерных клеток в поле зрения (клеточности) в КМ (кружки), селезенке (квадраты) и в тимусе (треугольники) в облученном контроле (а) и в эксперименте с облучением и последующей трансплантацией КМ (б) в течение 35 сут после облучения.

чение клеточности органа (рис. 4б). На 70-е сутки после облучения количество GFP⁺-клеток у реципиентов ($17,9 \pm 9,0\%$) превышает таковое у интактного GFP⁺ контроля примерно в два раза, что, вероятно, связано с продолжающимися активными репарационными процессами в тимусе с участием донорских клеток. Высокий процент GFP⁺ клеток ($21,4 \pm 2,2\%$) на 285-е сутки после облучения связан с инволюцией тимуса и резким уменьшением общей клеточности органа.

Следует отметить, что инволюция тимуса происходит и у интактного контроля, примерно в 80% случаев в возрасте около 12 месяцев у таких мышей тимус отсутствует. Возраст мышей экспериментальной группы к концу периода наблюдения составил примерно 15 месяцев, однако, несмотря на то, что животные были облучены в сублетальной дозе 7 Гр, тимус у них сохранялся длительное время, в то время как

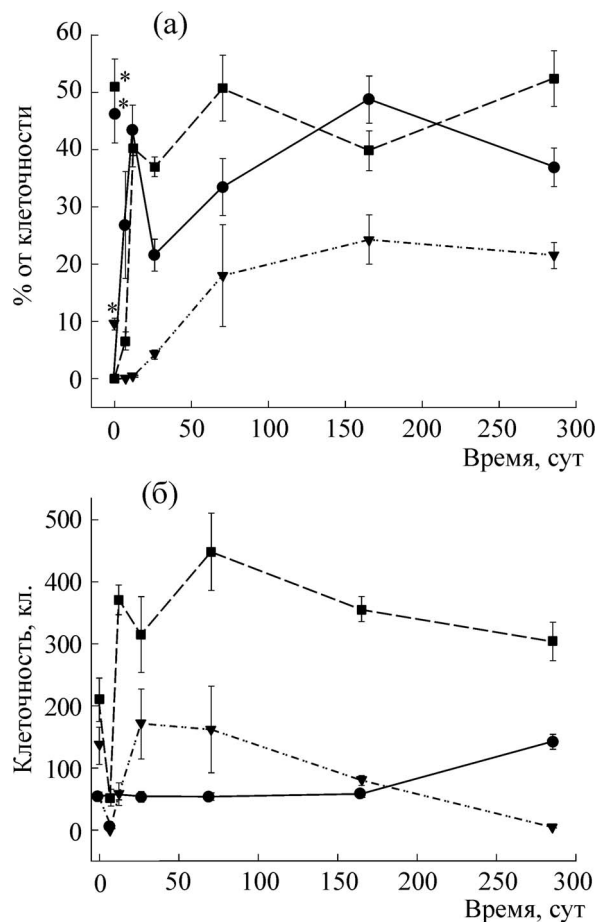


Рис. 4. Динамика заселения КМ (кружки), селезенки (квадраты) и тимуса (треугольники) GFP⁺-клетками донора в % от среднего количества ядерных клеток в поле зрения (клеточности) (а) и изменение среднего количества ядерных клеток в поле зрения (клеточности) исследуемых органов (б) в эксперименте с облучением и последующей трансплантацией КМ в течение 285 сут после облучения. * – Количество GFP⁺-клеток (в %) от среднего количества ядерных клеток в поле зрения (клеточности) у интактной GFP⁺-мыши.

у облученного контроля к 30-ти суткам после облучения тимус не восстанавливался (рис. 2а).

Значение средней интенсивности флуоресценции на длине волны 508 нм GFP⁺ клеток в КМ реципиента составило $0,38 \pm 0,05$ усл. ед. В GFP⁺-клетках донора средняя интенсивность флуоресценции была несколько ниже ($0,34 \pm 0,01$). Сравнение распределения клеток по интенсивности флуоресценции показало, что диапазон распределения клеток в эксперименте несколько шире, чем в контроле (рис. 5). Присутствие большего количества ярких клеток у мышей экспериментальной группы, вероятно, связано с их более высокой пролиферативной активностью при заселении облученного орга-

Таблица 2. Изменение количества клеток, экспрессирующих CD-маркеры гематопозитических клеток КМ (в % от среднего количества всех ядерных клеток КМ в поле зрения (клеточности)) у мышей экспериментальной группы с облучением и последующей трансплантацией КМ

Сутки после облучения	Клеточность	CD117		CD34		CD90.2		CD45R/B220	
		GFP ⁻	GFP ⁺	GFP ⁻	GFP ⁺	GFP ⁻	GFP ⁺	GFP ⁻	GFP ⁺
Интактный контроль	82,8 ± 1,7	4,6 ± 0,3	–	3,1 ± 0,3	–	5,9 ± 0,3	–	11,8 ± 0,2	–
20	19,6 ± 1,2	7,4 ± 0,4	9,1 ± 0,5	8,3 ± 0,4	6,6 ± 0,3	–	–	–	–
53	85,0 ± 3,8	4,2 ± 0,3	3,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2	2,7 ± 0,3	3,5 ± 0,2	2,2 ± 0,2	11,1 ± 0,3	13,0 ± 0,4
71	60,4 ± 6,0	3,0 ± 0,3	2,6 ± 0,3	1,1 ± 0,1	2,3 ± 0,5	2,3 ± 0,2	2,7 ± 0,3	14,9 ± 3,2	8,0 ± 1,9
100	68,0 ± 2,9	3,0 ± 0,2	6,8 ± 0,3	1,4 ± 0,2	4,1 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,9 ± 0,3
285	144,9 ± 12,9	2,1 ± 0,5	3,7 ± 0,6	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,2	3,1 ± 0,1	1,5 ± 0,3

низма реципиента, а наличие клеток с низкой интенсивностью – с гибелью части клеток.

Исследование поверхности селезенки под флуоресцентным микроскопом в экспериментальной группе мышей с облучением и последующей трансплантацией КМ показало, что уже на пятые сутки после облучения как на поверхности, так и в более глубоких слоях появляются отдельные группы донорских флуоресцирующих клеток, расположенных группами вокруг сосудов. Далее к 12–13-м суткам колонии разрастаются, занимают всю поверхность селезенки и вскоре сливаются, а через некоторое время внешне такая селезенка не отличается от селезенки интактных GFP⁺-мышей. В нашем эксперименте при облучении в дозе 7 Гр и количестве вводимых донорских клеток $(11,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$ не происходит образование выпуклых колоний на поверхности селезенки ни из донорских, ни из собственных клеток реципиента.

В отличие от этого, у мышей в группе облученного контроля единичные выпуклые колонии на поверхности селезенки появляются на восьмые сутки после облучения, максимальное их количество наблюдается на 16-е сутки, затем они сливаются и масса селезенки значительно увеличивается и превышает контрольные значения до конца периода наблюдения. Таким образом, изучение колониеобразования в целой селезенке также подтверждает, что восстановление органа у экспериментальных животных начинается в более ранние сроки, а исследуемые параметры быстрее возвращаются к контрольному уровню.

Для выяснения роли поверхностного фенотипа донорских клеток в восстановлении клеточной популяции системы крови облученных реципиентов исследовали экспрессию характеристических маркеров стволовых клеток CD117, CD34, а также маркеры Т- и В-клеток (CD90.2

и CD45R/B220 соответственно). Иммунофенотипирование с использованием моноклональных антител показало (табл. 2), что в КМ реципиентов количество клеток, экспрессирующих CD 117, остается высоким на протяжении всего периода наблюдения, причем в большинстве случаев процент CD117 GFP⁺-клеток несколько выше, чем процент CD117 GFP⁻-клеток. Если принять во внимание, что в КМ GFP⁺-мышей-доноров около половины клеток являются GFP⁻-клетками, то можно предположить, что у реципиентов большинство флуоресцирующих CD117, являются клетками донора. Те же самые выводы можно сделать и относительно клеток, экспрессирующих CD34 маркеры, хотя на 285-е сутки после облучения их количество значительно понизилось. Также снижение количества клеток, экспрессирующих CD90.2 и CD45R/ B220, отмечается на 100-е и 285-е сутки после облучения в КМ мышей-реципиентов.

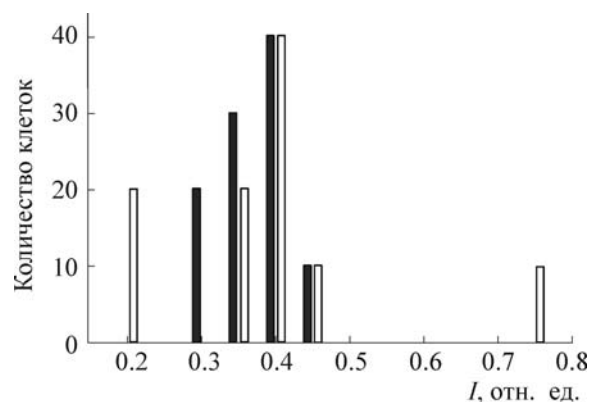


Рис. 5. Распределение GFP⁺-клеток КМ по интенсивности флуоресценции на длине волны 508 нм в эксперименте с облучением и последующей трансплантацией КМ (светлые столбцы) и в интактном контроле (темные столбцы).

Таблица 3. Изменение количества клеток, экспрессирующих CD-маркеры гематопозитических клеток селезенки (в % от среднего количества всех ядерных клеток селезенки в поле зрения (клеточности)) у мышей экспериментальной группы с облучением и последующей трансплантацией КМ

Сутки после облучения	Клеточность	CD117		CD34		CD90.2		CD45R/B220	
		GFP ⁻	GFP ⁺	GFP ⁻	GFP ⁺	GFP ⁻	GFP ⁺	GFP ⁻	GFP ⁺
Интактный контроль	119,4 ± 8,8	2,1 ± 0,2		2,9 ± 0,3		27,4 ± 0,6		51,4 ± 1,1	
53	174,5 ± 12,4	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	2,7 ± 0,2	10,7 ± 0,8	7,1 ± 0,6	19,9 ± 2,1	33,1 ± 2,2
71	172,5 ± 11,7	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	2,1 ± 0,3	5,5 ± 0,5	2,9 ± 0,2	17,5 ± 0,6	27,5 ± 1,0
100	113,4 ± 4,8	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,9 ± 0,3	6,4 ± 0,6	8,5 ± 0,5	10,7 ± 0,7	22,0 ± 0,8

Экспрессию тех же характеристических маркеров на клетках селезенки мышей экспериментальной группы исследовали в течение 100 суток после облучения (табл. 3). Процент клеток в селезенке, экспрессирующих CD117, в группе интактного контроля был более чем в два раза ниже, чем в КМ. У реципиентов в отдаленные сроки после облучения количество этих клеток находилось на уровне контрольного, либо незначительно превышало его. Так же как и в КМ большинство клеток, экспрессирующих CD117, является клетками донора. Схожая ситуация наблюдается с клетками селезенки, экспрессирующими CD34. Процент клеток селезенки с маркером CD90.2 в эти сроки заметно ниже, чем в контрольной группе. Также снижается к концу срока наблюдения и количество клеток селезенки с маркером CD45R/B220, хотя процент как этих клеток, так и клеток, экспрессирующих маркер CD90.2, в селезенке реципиентов значительно выше, чем в КМ.

Таким образом, иммунофенотипирование основных характеристических маркеров клеток системы крови у мышей-реципиентов как в КМ, так и в селезенке показало, что процент клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток CD117 и CD34, остается выше контрольного уровня длительное время после облучения. Более половины, а в большинстве случаев и две трети клеток, экспрессирующих все исследованные в данной работе маркеры, являются клетками донора.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных в данной работе результатов следует, что трансплантация донорского КМ существенно продлевает жизнь мышам-реципиентам. Более высокий регенеративный потенциал донорских клеток у молодых реципиентов может быть причиной более значительного увеличения продолжительности их дожития по сравнению со старыми реципиентами (на 367

и 98% соответственно по сравнению с облученным контролем). Этот результат подтверждается литературными данными о том, что хоуминг трансплантированных гематопозитических стволовых клеток (ГСК) снижен в организме старых мышей-реципиентов по сравнению с молодыми [21–23].

Наши данные о несколько сниженной эффективности КМ от старых мышей соответствуют результатам работы [24], в которой после сингенной пересадки цельного КМ от таких доноров СПЖ облученных животных оказалась значительно меньше интактного контроля. Авторы этой работы также показали, что клетки донорского КМ не вносят вклад в какие-либо другие клеточные линии, кроме гематопозитической. Этим, вероятно, объясняется то, что трансплантация цельного КМ в нашей работе не позволила восстановить СПЖ облученных животных до СПЖ интактного контроля. То, что КМ от старых доноров менее эффективен, чем КМ от молодых доноров, вероятно, объясняется повышенной геномной нестабильностью ГСК, содержащихся в КМ старых мышей [25,26]. Возможно также, что это связано с тем, что ГСК старых мышей в организме реципиентов дают начало преимущественно миелоидным клеткам в ущерб лимфоидному ростку кроветворения, а также имеют пониженную адгезию внутри ниш в КМ [21,27,28]. То, что СПЖ после трансплантации КМ у облученных молодых животных меньше, чем у интактного контроля, было показано не только в нашем эксперименте, но также и в других работах [29].

Есть данные, что внутривенное введение может приводить к эффективному заселению костной полости стромальными клетками, если использовать не цельную фракцию КМ, а только культивированные мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга. Такое введение МСК от молодых мышей облученным старым мышам приводит к миграции этих кле-

ток в КМ с последующей дифференцировкой в остеобласты [30]. С учетом этих данных и того, что после облучения нарушается не только гемопоэз, но и целостность ниш ГСК, образованных МСК, эндотелиальными клетками и нейронами симпатической нервной системы [31–33], можно сделать вывод о том, что заранее размноженные *in vitro* МСК, выделенные из КМ доноров, после трансплантации обеспечат восстановление ниш, а совместное введение КМ и МСК позволит, вероятно, обеспечить дифференцировку и пролиферацию как МСК, так ГСК *in vivo*. В результате можно ожидать увеличения продолжительности жизни облученных мышей до интактного контроля.

Кроветворная система, характеризующаяся высокой скоростью клеточного обновления, является основной мишенью радиации, а эритроцитарный и тромбоцитарный ростки – основными типами клеток, определяющими выживание или гибель облученного организма [34]. Проводимый нами прижизненный мониторинг заселения реципиента клетками GFP⁺-донора по капле крови показал, что обнаруженные в крови экспериментальных животных тромбоциты являются, главным образом, донорскими. Отсутствие таких тромбоцитов в крови было прогностически неблагоприятным фактором и сопровождалось гибелью животных. Эти данные подтверждаются работой [35], в которой было установлено, что после трансплантации именно общие миелоидные или мегакариоцито-эритроидные предшественники защищают мышей от облучения с дозозависимой эффективностью. При введении короткоживущих мегакариоцито-эритроидных предшественников уже через месяц после трансплантации они не регистрируются в периферической крови, и гемопоэз восстанавливается только за счет клеток собственного организма. Более позднее восстановление гемопоэза связывают с работой долгоживущих самообновляющихся гематопоэтических стволовых клеток, которые генерируют все типы клеток крови [35,38].

В нашем исследовании анализ распределения количества донорских GFP⁺-клеток по времени после облучения в КМ и селезенке реципиента показал, что на двенадцатые сутки после облучения количество GFP⁺-клеток у реципиента приближалось к таковому в интактном GFP⁺-контроле. Примерно через месяц после облучения происходил спад в количестве донорских клеток, что мы связываем с истощением пула короткоживущих стволовых клеток. Дальнейшее увеличение количества GFP⁺-клеток в этих органах, вероятно, связано уже с

работой долгоживущих стволовых клеток донора.

Известно, что маркер CD117 экспрессируется на мультипотентных ГСК, а также на предшественниках, коммитированных к миелоидному и эритроидному лиганду [35,36]. Нами обнаружено, что экспрессия маркера стволовых клеток CD117 у мышей-реципиентов на мембранах исследуемых нами GFP⁺-клеток как в КМ, так и в селезенке наблюдается у большой доли клеток в течение более чем трех месяцев после облучения. Это свидетельствует об активном функционировании как мультипотентных, так и общих миелоидных предшественников клеток донора в организме реципиентов. Высокий процент клеток, экспрессирующих CD117, при долговременном заселении реципиента отмечается также в работе [37]. Снижение через три месяца после облучения процента клеток, экспрессирующих маркеры CD90.2 и CD45R/B220, при одновременно большой доле CD117-положительных клеток в нашей работе может свидетельствовать о доминировании общих миелоидных предшественников звена в ущерб общему лимфоцитарному предшественнику. Это также может подтверждаться тем, что высокая репопуляция, в частности, Т-клеточного звена обеспечивается предшественниками с низким уровнем экспрессии CD117 [38]. Зарегистрированное нами доминирование общих миелоидных предшественников у мышей-реципиентов может быть связано с их возрастом. Так, в работе [39] показано, что общее содержание гранулоцитарных клеток с возрастом закономерно увеличивается: соотношение гранулоцитов к лимфоцитам изменяется от 56 : 44 в три месяца до 77 : 23 в пятнадцать месяцев.

В отличие от КМ и селезенки в тимусе реципиента заметное заселение донорскими клетками начиналось на 26-е сутки после облучения и оставалось высоким до конца периода наблюдения. Такое позднее заселение тимуса согласуется с данными работы [40], где показано, что мультипотентные клетки способны дифференцироваться, давая клеточные клоны предшественников Т-клеток только на четвертой неделе после трансплантации их в тимус облученных в дозе 7 Гр мышей. В нашей работе высокий процент донорских клеток в тимусе к концу срока наблюдения объясняется инволюцией тимуса и резким уменьшением количества собственных клеток в тимусе у животных такого возраста (около пятнадцати месяцев).

Таким образом, использование в качестве доноров мышей, содержащих трансген *egfp*, позволило: провести пожизненный мониторинг ус-

пешности трансплантации КМ по капле крови реципиента, исследовать динамику распределения клеток донора в органах системы крови реципиента, определить колонии донора на поверхности селезенки, выявить среди клеток реципиента клетки донора, экспрессирующие характеристические маркеры гематопоетических клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе результаты в модельных экспериментах на сингенной линии мышей с использованием в качестве доноров мышей, экспрессирующих EGFP, демонстрируют тотальное пожизненное заселение органов реципиента (КМ, селезенки, тимуса, крови) клетками донора с существенным продлением жизни облученных животных по сравнению с облученным контролем.

Эти результаты совместно с предложенной нами ранее информационной теорией старения [10], согласно которой основной причиной старения является накопление ошибок в геноме вследствие воздействия внешних факторов, позволяют сделать вывод о возможности лечения и омоложения путем замены клеточного состава в стареющем организме клетками, геном которых содержит меньшее число ошибок. Для человека такая возможность может быть реализована путем ауто трансплантации клеток, крио-сохраненных в молодом возрасте [41].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. Bach, R. Albertini, P. Joo, et al., *Lancet* **292** (7583), 1364 (1968).
2. R. Gatti, H. Meuwissen, H. Allen, et al., *Lancet* **292** (7583), 1366 (1968).
3. С. Н. Абдусаламов, К. Н. Мелкова, Н. В. Горбунова и др., *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* **3**, 1 (2010).
4. И. И. Дедов, А. Н. Тюльпаков, В. П. Чехонин и др., *Вестн. РАМН* **67**, 12 (2012).
5. В. Г. Савченко, Е. Н. Паровичникова., Б. В. Афанасьев и др., *Гематология и трансфузиология* **59** (S2), 2 (2014).
6. S. Ezzone and K. Schmit-Pokorny, *Blood and marrow stem cell transplantation*. (Jones & Bartlett Learning, 2007).
7. Н. К. Шахпазян, Т. А. Астрелина и М. В. Яковлева, *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* **7** (1), 23 (2012).
8. L. Fouillard, M. Bensidhoum, D. Bories, et al., *Leukemia* **17**, 474 (2003).
9. R. Quarto, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, et al., *N. Engl. J. Med.* **344**, 385 (2001).
10. А. В. Карнаузов и Е. В. Карнаухова, *Биофизика* **54** (4), 726 (2009).
11. А. В. Карнаузов, Е. В. Карнаухова, Л. А. Сергиевич и др., *Биофизика* **59** (4), 790 (2014).
12. А. В. Карнаузов, Е. В. Карнаухова, Л. А. Сергиевич и др., *Биофизика* **59** (6), 1135 (2014).
13. Е. В. Богданенко, А. В. Карнаузов, Е. В. Карнаухова и др., *Патогенез* **13** (3), 13 (2015).
14. Л. А. Сергиевич, А. В. Карнаузов, Е. В. Карнаухова и др., *Биофизика* **59** (4), 740 (2014).
15. Е. В. Богданенко, Л. А. Сергиевич, А. В. Карнаузов и др., *Патогенез* **15** (1), 24 (2017).
16. M. Okabe, M. Ikawa, K. Kominami, et al., *FEBS Lett.* **407** (3), 313 (1997).
17. N. Kawakami, N. Sakane, F. Nishizawa, et al., *Immunol. Lett.* **70** (3), 165 (2000).
18. D. J. Manfra, S. C. Chen, T. Yang, et al., *Am. J. Pathol.* **158**, 41 (2001).
19. J. Hayakawa, M. Migita, T. Ueda, et al., *Int. J. Hematol.* **77**, 456 (2003).
20. В. А. Карнаузов, Н. А. Карнаухова, Л. А. Сергиевич и В. Н. Карнаузов, в сб. *III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии* (Москва, 2010), т. 4, сс. 43–46.
21. S. M. Chambers, C. A. Shaw, C. Gatza, et al., *PLoS Biol.* **5**, e201 (2007).
22. Y. Liang, Z. Van, and S. Szilvassy, *Blood* **106**, 1479 (2005).
23. S. J. Morrison, A. M. Wandycz, K. Akashi, et al., *Nat. Med.* **2**, 2011 (1996).
24. I. Guest, Z. Ilic, H. Scoble, and S. Sell, *Aging* **7** (12), 1212 (2015).
25. A. Nijnik, L. Woodbine, C. Marchetti, et al., *Nature* **447**, 686 (2007).
26. D. J. Rossi, D. Bryder, and I. L. Weissman, *Exp. Gerontol.* **42**, 385 (2007).
27. K. Sudo, H. Ema, Y. Morita, et al., *J. Exp. Med.* **192**, 1273 (2000).
28. M. Kim, H. B. Moon, G. J. Spangrude, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **996**, 195 (2003).
29. E. Birkenmeier, J. Barker, C. Vogler, et al., *Blood* **78**, 3081 (1991).
30. J. Shen, Y. Tsai, and N. M. DiMarco, *Scientific Reports* **1** (67), 1 (2011).
31. S. Mendez-Ferrer, D. Lucas, M. Battista, et al., *Nature* **452**, 442 (2008).
32. L. Ding, T. L. Saunders, G. Enikolopov, et al., *Nature* **481**, 457 (2012).
33. S. Mendez-Ferrer, T. V. Michurina, F. Ferraro, et al., *Nature* **466**, 829 (2010).
34. С. П. Ярмоненко, *Радиобиология человека и животных* (Высш. шк., М., 1988).
35. T. Nakorn, D. Traver, I. L. Weissman, et al., *J. Clin. Invest.* **109** (12), 1579 (2002).

36. A. Barclay, M. H. Brown, S. A. Law, et al., *The leukocyte antigen factsbook* (Academic Press, 1997).
37. S. J. Morrison and I. L. Weissman, *Immunity* **1**, 661, (1994).
38. T. D. Randall and I. L. Weissman, *Blood* **89** (10), 3596 (1997).
39. И. Д. Горизонтов, О. И. Белоусова и М. И. Федотова, *Стресс и система крови* (Медицина, М., 1983).
40. G. J. Spangrude, C. E. Muller-Sieburg, S. Heimfeld, et al., *J. Exp. Med.* **167**, 1671 (1988).
41. A. V. Karnaukhov, E. V. Karnaukhova, L. A. Sergievich, et al. *J. Biophys.* (2015). Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jbp/aip/686249/>

The Study of the Regenerative Potential of Bone Marrow Cells of Donor Mice Carrying the *egfp* Gene in Irradiated Mice

L.A. Sergievich*, E.V. Karnaukhova*, A.V. Karnaukhov*, N.A. Karnaukhova*, E.V. Bogdanenko**, I.A. Lizunova*, and V.N. Karnaukhov*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia*

The regenerative potential of bone marrow cells, expressing enhanced green fluorescent protein in donor mice irradiated with a dose of 7 Gy, was studied. Expression of this protein contributed to a long-term monitoring of transplanted cells in the recipient's blood. After transplantation, life span of young and old recipients increased by 93% and 15%, respectively. Overall colonization of the bone marrow, spleen, thymus and blood of the recipient by bone marrow cells from the donor mouse has been shown. At the studied radiation dose and number of transplanted cells ($11.7 \pm 0.4 \cdot 10^6$), only the donor colonies have been detected on the surface of the spleen. The percentage of the bone marrow cells and spleen cells expressing the stem cell markers CD117 and CD34 in mice-recipients remained above the control level for a long time after irradiation. More than half of the cells with the phenotypes of CD117, CD34, CD90.2 and CD45R/B220 in the studied organs were donor cells. Further detailed study of the specificities of cell engraftment in a recipient of bone-marrow both without pretreatment, and after exposure of the recipients to extreme factors helps improve techniques for cell therapy.

Keywords: transplantation, bone marrow, irradiation, life span, GFP⁺ mice, information theory of ageing