Влияние тяжелой политравмы на миграцию стволовых кроветворных клеток у мышей

В.Н. Александров, В.С. Сергеев
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Показано, что стволовые кроветворные клетки (СКК) участвуют в физиологической и репаративной регенерации негематопоэтических тканей и органов посредством трансдифференцировки и/или клеточного слияния. В связи с этим представляется интересным оценить кинетику СКК костного мозга при тяжелой травме . В исследовании использовали три экспериментальные модели: травмирование мышей с последующим неравномерным облучением в летальных дозах с экранированием 1/2 голени (А), облучение мышей в летальных дозах с последующей трансплантацией клеток костного мозга от травмированных мышей (Б), травмирование мышей с последующим облучением в сублетальных дозах (В). Миграцию СКК оценивали путем регистрации кроветворных колоний, вырастающих на селезенке облученных мышей из эндо- или экзогенных СКК. В экспериментальных моделях А и В показано, что в селезенках травмированных мышей формируется достоверно большее количество эндоколоний в сравнении с мышами групп контроля. В экспериментальной модели Б показано, что костный мозг травмированных мышей содержит достоверно меньшее количество способных к миграции СКК. На основании полученных результатов сделан вывод, что тяжелая политравма индуцирует миграцию СКК у мышей.

Ключевые слова: тяжелая политравма, миелоидные стволовые кроветворные клетки, миграция.

Введение

Тяжелая политравма с повреждениями головного мозга, легких, печени, почек, кишечника, кожи, из-за прямого или опосредованного ишемией воздействия приводит к активизации репаративных процессов. Изучение роли разных видов стволовых клеток в этих процессах представляет собой значительный интерес в связи с недавним открытием феноменов трансдифференцировки и клеточного слияния.

Ранее обнаружено, что стволовые кроветворные клетки (СКК) способны *in toto* дифференцироваться в клетки различной линейной принадлежности, в частности, гепатоциты, нейроны и кардиомиоциты [1, 2]. Тем не менее, более тщательно спланированные исследования *in vivo* показали, что так называемая трасдифференцировка СКК является чрезвычайно редким событием, если вообще имеет место [3, 4]. Кроме того, СКК могут сливаться с соматическими клетками, и такие гибриды несут маркеры обоих «родительских» клеток [5]. Несмотря на то, что трансдифференцировка СКК остается предметом дискуссий, многие исследователи считают, что СКК могут играть значительную роль в репаративных процессах. Придается большое значение трансдифференцировке СКК в миогенные стволовые клетки при регенерации поперечно-полосатых мышц [6], клеточному слиянию СКК с кардиомиоцитами и гепатоцитами при регенерации печени и сердца [7, 8], секреции СКК факторов роста и непосредственную дифференцировку в клетки эндотелия в васкулогенезе [9]. Особенно убедительны данные об участии СКК костного мозга в образовании сосудистой сети метастазов [10].

Такие факторы и воздействия, как облучение, полихимиотерапия, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, пептидные антагонисты хемокина SDF-1 (stromal-derived factor – 1), и даже гипербарическая оксигенация, способны индуцировать миграцию СКК из костного мозга в кровь [11-13]. Учитывая изложенный выше материал, представляется, что биологическое значение феномена миграции СКК в постнатальном периоде заключается не только в поддержании функции гематопоэза, но и в поддержании достаточного количества необходимых для физиологической и репаративной регенерации СКК в органах и тканях. Ранее показано, что инфаркт миокарда, некроз части печени могут сопровождаться миграцией СКК костного мозга в место повреждения [14, 26, 28]. С другой стороны, получены противоположные результаты [15], и миграция СКК костного мозга при травмах/повреждениях внутренних органов остается предметом дискуссий.

Целью данного исследования является изучение влияния тяжелой политравмы на миграцию стволовых кроветворных клеток у мышей.

Материал и методы

Проводили три эксперимента (А, Б, В).

Эксперимент А – мышам из опытной группы наносили повреждения и затем подвергали облучению в летальных дозах с экранированием части костного мозга; мыши контрольной группы перед облучением в летальных дозах с экранированием части костного мозга травмы не получали.

Эксперимент Б – мыши опытной группы подвергались облучению в летальных дозах с последующей трансплантацией клеток костного мозга от мышей, получивших тяжелую политравму; мышам контрольной группы после облучения в летальных дозах трансплантировали костный мозг от здоровых мышей.

Эксперимент В – мышам опытной группы наносили повреждения с последующим облучением в сублетальных дозах; мыши контрольной группы перед облучением в сублетальных дозах травм не получали.

На восьмые сутки после облучения определяли число колоний на селезенке, образовавшихся за счет мигрировавших СКК экранированного участка костного мозга (эксперимент А), трансплантированного костного мозга (эксперимент Б) или остаточных СКК костного мозга после сублетального облучения (эксперимент В).

В исследовании использовали самок мышей-гибридов F1(CBAxC57BL6) массой 16-18 г.

Травму вызывали по методу Нобла–Коллипа (Noble–Collip). Животных травмировали во вращающемся металлическом барабане. При вращении мыши поднимались его внутренними выступами на высоту 40 см и, неспособные удерживаться вследствие обездвиженности (лапы перед вращением фиксировали пластырем), получали множественные удары при многократных падениях. Каждая новая партия животных получала травму тяжелой степени (летальность в первые двое суток, то есть в период первичных реакций, 30–40%), что достигалось определением необходимого числа оборотов барабана (как правило, от 350 до 450) в предварительных опытах.

Мышей облучали в контейнерах на аппарате РУМ–17. Мощность дозы 108 рентген в мин., напряжение на трубке 250 кв, сила тока 15 ма, фильтры: 0,5 мм Си и 1 мм Al, расстояние 50 см. Доза 100/13 для гибридов F1(CBA–C57Bl6) 8,0 Гр при летальном облучении, 6,5 Гр – при сублетальном облучении.

В эксперименте А мышам во время летального облучения экранировали участок костного мозга (1/2 голени). Учитывая возможность вымывания СКК из костного мозга в кровь при переломах, исключали перелом костей голени в обеих группах рентгенографическим исследованием.

В эксперименте Б костный мозг получали сразу после цервикальной дислокации из интактных (без переломов) бедренных костей, вымывая и ресуспендируя инъекционной иглой 1А1–04×20–1 15. Клеточную суспензию вводили в боковую вену хвоста в объеме 0,3 мл среды RPMI 1640 в концентрации 1×10^5 клеток на мышь.

Миграцию СКК оценивали путем регистрации кроветворных колоний, вырастающих в селезенке облученных мышей из эндо– (эксперименты А и В) или экзогенных (эксперимент Б) миелоидных стволовых клеток (Till J.E., McCalloch E.A., 1961, 1963) [16, 17].

Результаты

СКК экранированного костного мозга мигрируют в большей степени у мышей, перенесших тяжелую политравму (эксперимент А).

В селезенке мышей, перенесших тяжелую политравму и неравномерно летально облученных (с экранированием 1/2 голени), формируется достоверно больше кроветворных колоний по сравнению с их числом в селезенке контрольных животных. Количество кроветворных колоний у мышей опытной и контрольной групп, соответственно, составило 32±1 и 25±3 колоний (p <0,05) (табл. 1).

Таблица 1. **Миграция СКК из костного мозга неравномерно летально облученных травмированных мышей**

Группы мышей	Число опытов (мышей)	Кол-во колоний на селезенке	P
Контроль	2 (10)	25±3	<0,05
Опыт	2 (12)	32±1	

Костный мозг мышей, перенесших политравму, содержит меньшее количество способных к миграции СКК (эксперимент Б).

Перенос дозированного количества клеток костного мозга травмированного донора сингенному летально облученному реципиенту сопровождается накоплением достоверно меньшего числа колоний на селезенке по сравнению с их числом в селезенке реципиентов костного мозга интактных доноров (табл. 2). Количество кроветворных колоний у мышей опытной и контрольной групп, соответственно, составило 16±1 и 25±2 (p <0,05) в расчете на 1×10^5 трансплантированных клеток костного мозга (см. табл. 2).

Таблица 2. **Число колоний на селезенке летально облученных сингенных мышей–реципиентов клеток костного мозга доноров, перенесших тяжелую политравму**

Группы мышей	Число опытов (мышей)	Кол-во колоний в расчете на 10^5 клеток костного мозга	P
Реципиенты клеток интактных доноров	2 (18)	25±2	<0,05
Реципиенты клеток травмированных доноров	2 (13)	16±1	

При сублетальном облучении остаточные СКК мигрируют в большей степени у травмированных мышей (эксперимент В).

В селезенке сублетально облученных травмированных мышей формируется достоверно больше эндоколоний, чем в контроле, то есть в селезенке нетравмированных сублетально облученных животных. Количество кроветворных колоний у мышей опытной и контрольной групп, соответственно, составило 31±2 и 23±2 колоний (p <0.05) (табл.3).

Таблица 3. **Число колоний на селезенке сублетально облученных мышей, перенесших тяжелую политравму**

Группы мышей	Число опытов (мышей)	Кол-во колоний на селезенке	P
Контроль	2 (14)	23±2	<0,05
Опыт	2 (11)	31±2	

Обсуждение

Эксперименты А и В показали, что в селезенках мышей опытных групп формируется достоверно большее количество эндоколоний в сравнении с мышами групп контроля. Следовательно, опыты с эндоклонированием указывают на стимулирующий эффект тяжелой политравмы в отношении миграции СКК костного мозга у сублетально/летально облученных мышей. В эксперименте Б в селезенках мышей опытной группы отмечается достоверно меньшее количество экзоколоний в сравнении с мышами групп контроля. Следовательно, опыты с экзоклонированием СКК указывают на истощение костного мозга травмированных доноров в отношении способных к миграции СКК, что согласуется с индуцирующим эффектом тяжелой политравмы на миграцию исследуемых клеток. Таким образом, что тяжелая политравма у мышей индуцирует миграцию СКК костного мозга в систему кровообращения.

Альтернативным миграции вариантом, аналогично явлению тканевой эмболии, может являться вымывание СКК в кровь в местах переломов костей, содержащих костный мозг. Тем не менее, в экспериментах А и Б, используя рентгенографическое исследование голеней (эксперимент А) и визуальный осмотр отделенных от мышечной массы

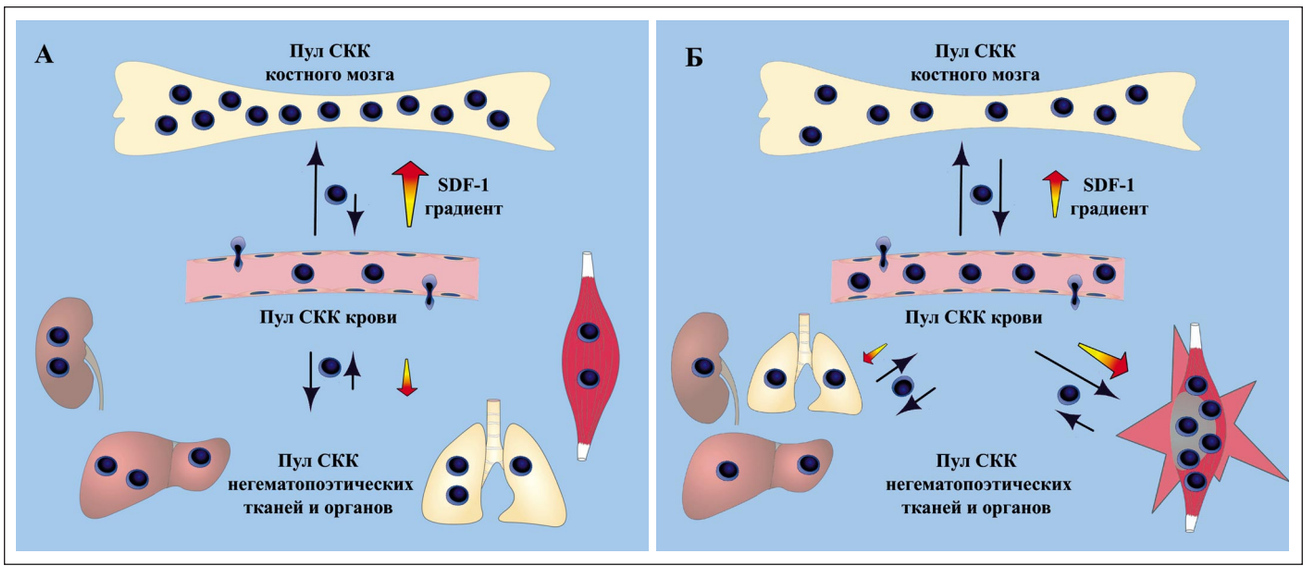
бедренных костей (эксперимент Б), переломы были исключены. Не представлялось возможным исключить вымывание клеток костного мозга, в том числе и СКК, в эксперименте В. Тем не менее, разница в количестве кроветворных колоний в селезенке в опытной и контрольной группах в эксперименте В сравнима с аналогичным показателем в эксперименте А. Таким образом, значение вымывания СКК костного мозга в эксперименте В незначительно.

В недавних исследованиях у различных видов млекопитающих обнаружено наличие типичных по иммунофенотипу СКК в скелетных мышцах, легких, печени и головном мозге [18–21]. Трансплантация таких клеток, аналогично СКК костного мозга и периферической крови, приводит к восстановлению функций гемопоэза. По крайней мере, для СКК скелетных мышц показано, что они имеют гематопоэтическое происхождение, а не являются результатом трансдифференцировки миогенных клеток–предшественников [22]. Восстановление гемопоэза у летально облученных мышей при трансплантации меченых клеток костного мозга, в свою очередь, приводит к миграции СКК в скелетные мышцы [23]. Таким образом, к настоящему времени СКК обнаружены во многих тканях и органах. Полученные данные о природе СКК скелетных мышц свидетельствуют о костномозговом их происхождении. Учитывая значительную способность СКК к миграции, представляется, что между СКК костного мозга, крови и других тканей и органов существует динамическое равновесие, которое при физиологических условиях в значительной степени смещено в сторону костного мозга.

Ранее показано, что SDF–1 играет ключевую роль в направленной миграции $CXCR4^+$ (рецептор для SFD–1) СКК [24, 25]. Благодаря высокому уровню экспрессии этого хемокина стромальными клетками происходит аккумуляция СКК в костном мозге в пре– и постнатальном периодах [25]. Интересно, что SDF–1 в сравнительно меньших количествах секретируется стромальными и эндотелиальными клетками других органов: сердца, скелетных мышц, печени, мозга, почек [26–30]. Супернатант культуры фибробластов скелетных мышц содержит SDF–1 и способен индуцировать хемотаксис $CXCR4^+$ СКК [27]. Таким образом, представляется, что описанное выше динамическое равновесие между СКК костного мозга, крови и других тканей и органов обусловлено градиентами концентраций хемокина SDF–1, которые на локальном уровне обуславливают миграцию СКК из крови в ткани и органы, а на системном – к значительному смещению описанного выше равновесия в сторону костного мозга.

Искусственное увеличение концентрации SDF–1 в плазме приводит к значительной миграции СКК из костного мозга в кровь [31]. С другой стороны, экспрессия данного хемокина может значительно возрастать в подвергшихся повреждению тканях [14, 28]. Локальная секреция значительных количеств SDF–1 в местах повреждения при тяжелых травмах, по–видимому, приводит к существенному изменению системного градиента концентрации SDF–1. В результате наблюдается показанная в данном исследовании миграция СКК из костного мозга в кровь. На локальном уровне высокие градиенты концентрации SDF–1, по–видимому, обуславливают миграцию СКК из крови в места повреждений, где они могут принимать участие в процессах репарации.

Предлагаемая нами модель динамического равновесия между СКК костного мозга, крови и других тканей и органов в норме и при патологии показана на рисунке.



Динамическое равновесие между СКК костного мозга, крови и негематопоэтических тканей и органов в норме и патологии:
А – в физиологических условиях равновесие значительно смещено в сторону костного мозга, что, по–видимому, обусловлено градиентом концентрации SDF–1;
Б – при травме (в данном случае мышц) происходит значительное смещение равновесия в сторону поврежденных органов, что опять же, возможно, обусловлено изменением градиента концентрации SDF–1. В негематопоэтических тканях и органах СКК, по–видимому, могут принимать участие в физиологической/репаративной регенерации посредством трансдифференцировки и/или клеточного слияния и/или секреции необходимых факторов роста

ЛИТЕРАТУРА:

1. Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell 2001; 105(3): 369-77.
2. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow cells regenerate infracted myocardium. Nature 2001; 410: 701–5.
3. Wagers A.J., Sherwood R.I., Christensen J.L., Weissman I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science 2002; 297: 2256–9.
4. Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. Nature 2004; 428: 664–8.
5. Terada N., Hamazaki T., Oka M. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature 2002: 416: 542–54.
6. Polesskaya A., Seale P., Rudnicki M.A. Wnt Signaling Induces the Myogenic Specification of Resident CD45$^+$ *Adult Stem Cells during Muscle Regeneration. Cell 2003;113: 841–52.*
8. Vassilopoulos G., Wang P.R. Russell D.W. et al. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature 2003; 422: 823-5.
9. Dekel B., Shezen E., Even-Tov-Friedman S. et al. Transplantation of human CD34$^+$CD133$^+$ hematopoietic stem cells into ischemic and growing kidneys suggests role in vasculogenesis but not tubulogenesis. Stem cells. First published online January 12, 2006.
10. Lyden D., Hattori K., Dias S. et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. Nat. Med. 2001; 11: 1194-201.
11. Thom S.R., Bhopale V.M. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006; 290: 1378-86.
12. Liles W.C., Rodger E., Broxmeyer H.E. et al. Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. Transfusion 2005; 45: 295-300.
13. Takeyama K., Ohto H. PBSC mobilization. Transfus. Apher. Sci. 2004; 31: 233-43.
14. Dalakas E., Newsome P.N., Harrison D.J., Plevris J.N. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. The FASEB Journal 2005; 19: 1225-31.
15. Di Campli C., Piscaglia A.C., Giuliante F. et al. No evidence of hematopoietic stem cell mobilization in patients submitted to hepatectomy or in patients with acute on chronic liver failure. Transplant Proc. 2005; 37: 2563-6.
16. Till J. E., McCalloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. Radiat. Res. 1961; 14: 213-22.
17. Till J.E., McCalloch E.A. Early repair in marrow cells irradiated and proliferation in vivo. Radiat. Res. 1963; 18: 96-105.
18. Abe S., Lauby G., Boyer G. et al. Lung Cells Transplanted to Irradiated Recipients Generate Lymphohematopoietic Progeny. Am. J. Respiratory Cell and Mol. Biol. 2004; 30; 491-9.
19. Kotton D.N., Fabian A.J., Mulligan R.C. A novel stem-cell population in adult liver with potent hematopoietic-reconstitution activity. Blood 2005; 106: 1574-80.
20. Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Immunology 1999; 96: 14482-6.
21. Jay K.E., Gallacher L., Bhatia M. Emergence of muscle and neural hematopoiesis in humans. Blood 2002; 100: 3193-202.
22. McKinney-Freeman S.L., Jackson K.A. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. PNAS 2002; 99: 1341-6.
23. Issarachai S., Priestley G.V., Nakamoto B. Cells with hemopoietic potential residing in muscle are itinerant bone marrow-derived cells. Exp. Hematol. 2002; 30: 366-73.
24. Aiuti A.,Webb I.J., Bleul C. et al. The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34 Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34 Progenitors to Peripheral Blood. J. Exp. Med. 1997; 185: 111-20.
25. Juarez J., Bendall L. SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis. Histol. Histopathol. 2004; 19: 299-309.
26. Askari A.T., Unzek S., Popovic Z.B. et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. Lancet 2003; 362: 697–703.
27. Ratajczak M.Z., Majka M., Kucia M. et al. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. Stem Cells 2003; 21: 363–71.
28. Hatch H.M., Zheng D., Jorgensen M.L. et al. SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. Cloning Stem Cells 2002; 4: 339–51.
29. Lazarini F., Tham T.N., Casanova P. et al. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. Glia 2003;42: 139–48.
30. Schrader A.J., Lechner O., Templin M. et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. Br. J. Cancer 2002; 86: 1250–6.
31. Hattori K., Heissig B., Tashiro K. et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. Blood 2001; 97: 3354-60.