



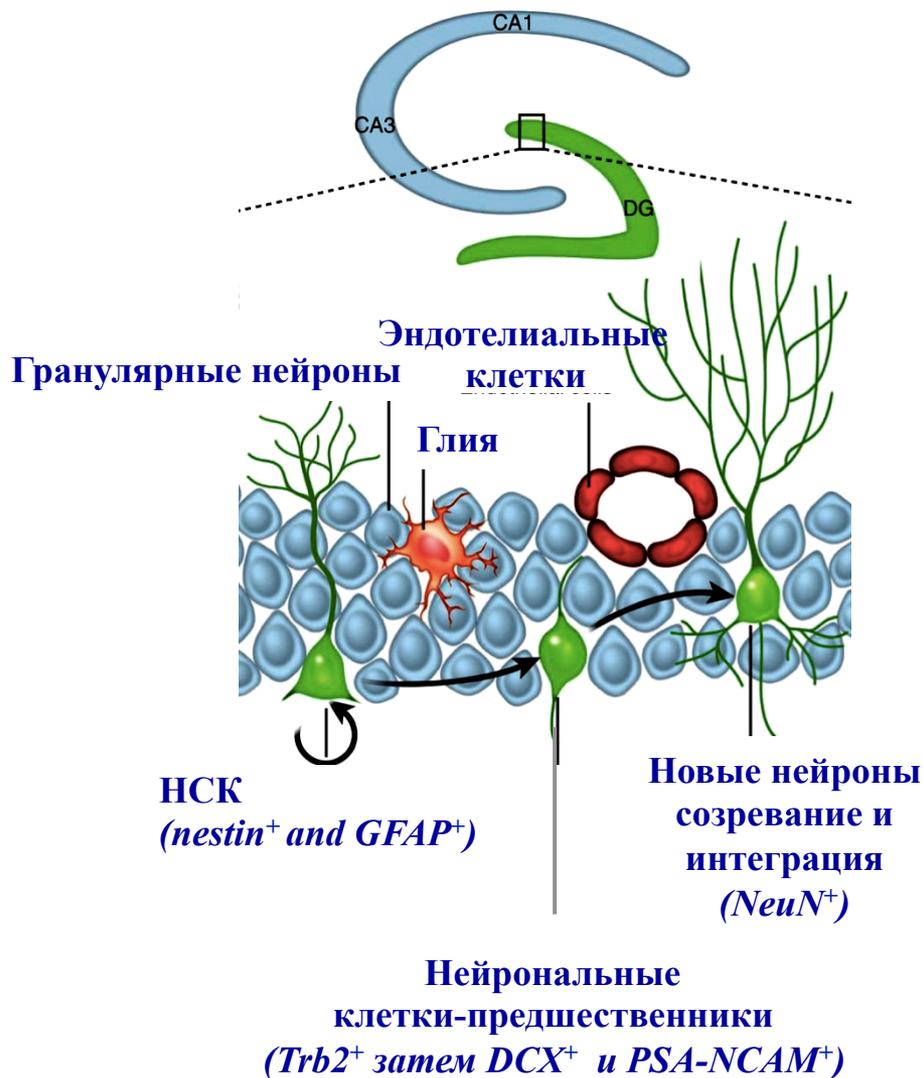
НИЦ «Курчатовский институт»

**Повышение выживаемости облученных нейтральных
стволовых клеток мыши под действием факторов,
секретируемых мезенхимальными стволовыми
клетками**

*Г.А. Посыпанова, М.Г. Ратушняк, Ю.П. Семочкина, О.В. Высоцкая, А.И. Глухов,
А.В. Родина, Е.Ю. Москалева*

**«ПРОБЛЕМЫ ХИМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ И РЕПАРАЦИИ
ПРИ РАДИАЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ»**

Дубна 2018



no DK Ma et al, 2010

При лучевой терапии опухолей, затрагивающей мозг, и при высокодозной химиотерапии в отдаленный период у больных развиваются нарушения когнитивных функций. Эти осложнения связывают с гибелью нейральных стволовых клеток (НСК), которые играют важную роль в регенерации мозга у человека и грызунов.

Во взрослом мозге НСК обнаружены в двух зонах - в субвентрикулярной зоне и в зубчатой извилине гиппокампа. В гиппокампе в субгранулярной зоне зубчатой извилины из НСК образуются нейральные клетки предшественники (НКП), которые

пролиферируют, мигрируют и дифференцируются в нейроны и глию гранулярного слоя.

Поэтому актуальной задачей является поиск средств, способных снизить гибель НСК. В нескольких исследованиях показано, что введение МСК облученным животным приводит к повышению их выживаемости. Использование кондиционированной среды МСК также способствовало повышению репарации радиационных повреждений. У людей при использовании МСК для лечения острых лучевых поражений обнаружено улучшение процессов регенерации.

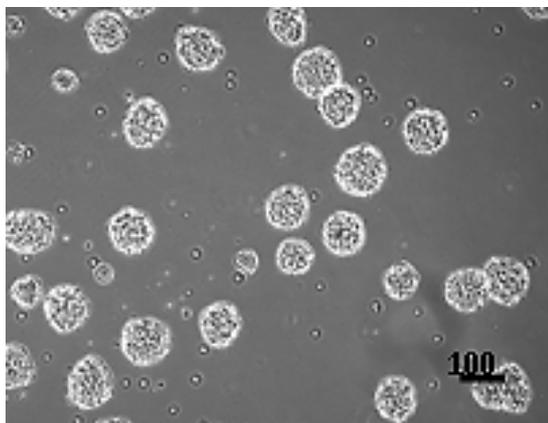
В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение влияния факторов, секретируемых МСК, на выживаемость облученных НСК мыши.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

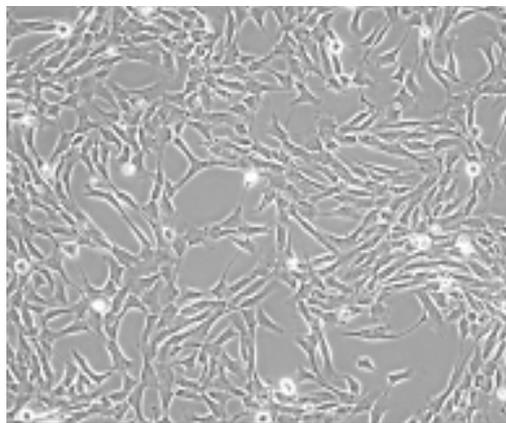
- 1. Культивирование клеток**
- 2. Иммуноцитохимический анализ**
- 3. Фенотипирование по набору специфических антигенов с помощью проточной цитометрии**
- 4. Облучение клеток**
- 5. Определение уровня цитокинов с помощью иммуноферментного анализа**
- 6. Световая микроскопия**
- 7. Флуоресцентная микроскопия**
- 8. Статистический анализ**

ХАРАКТЕРИСТИКА НСК МЫШИ

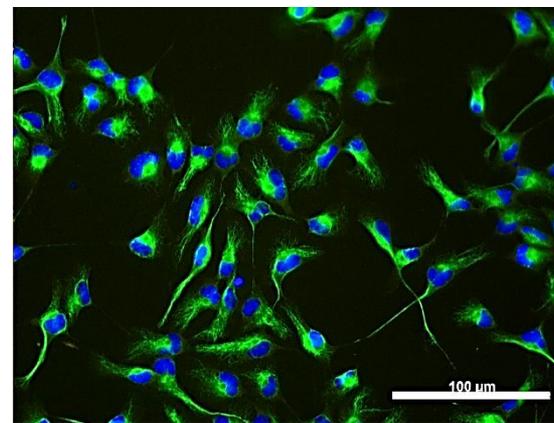
А.



Б.



В.

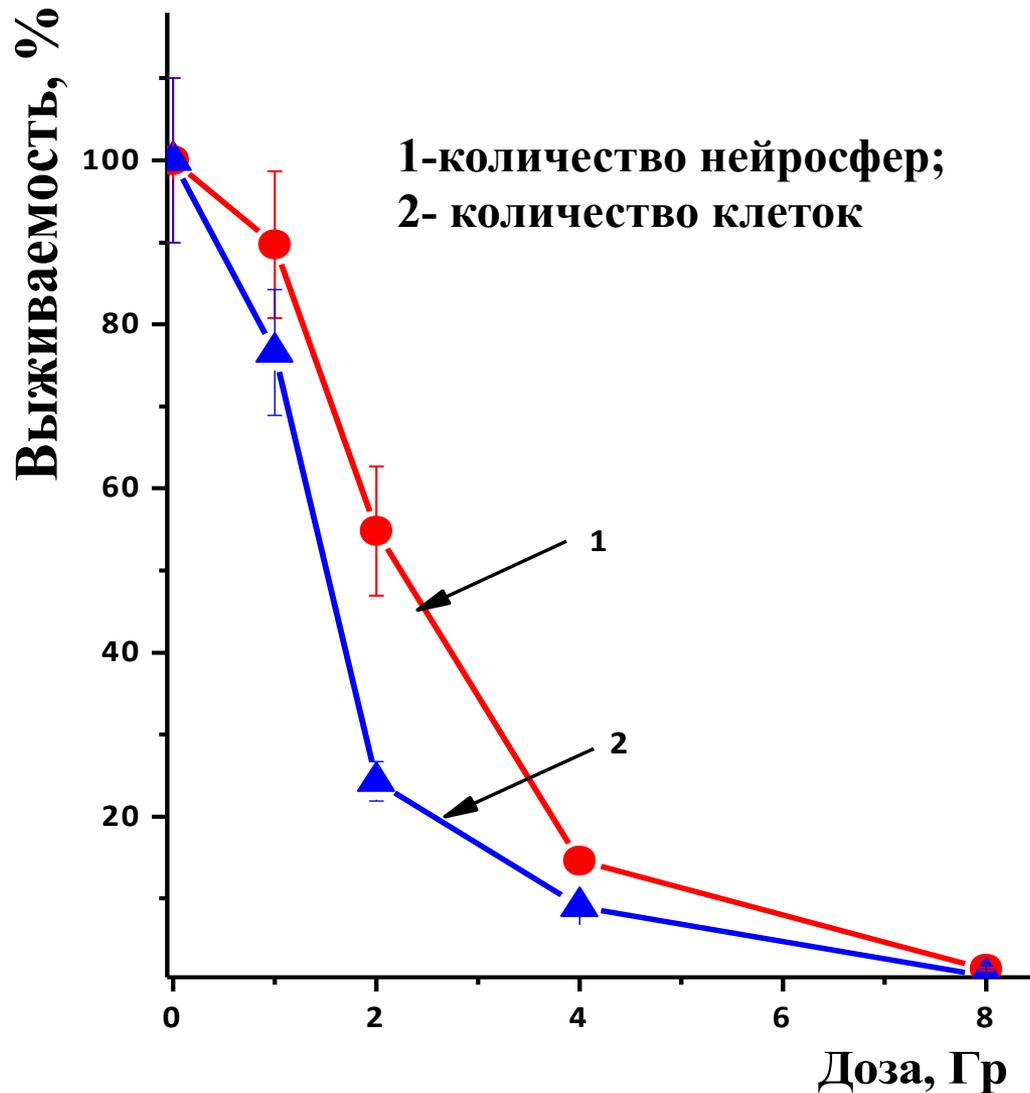
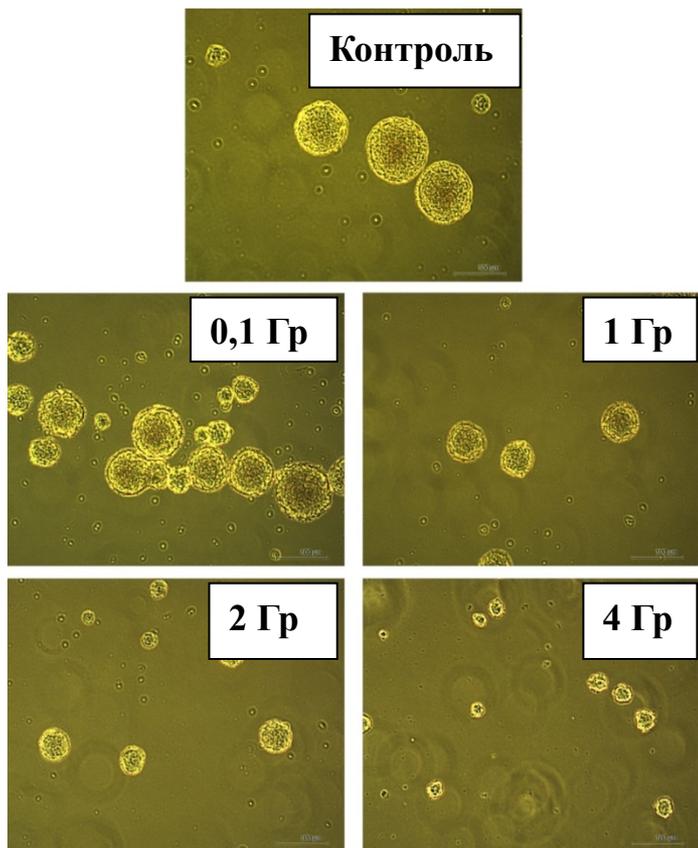


С помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии показано, что 86-92% выделенных и культивируемых *in vitro* клеток (6-9 пассаж) в виде нейросфер и в виде прикрепляющихся клеток являются нестин-положительными.

В популяции НСК присутствует небольшое количество клеток, содержащих маркеры дифференцировки:

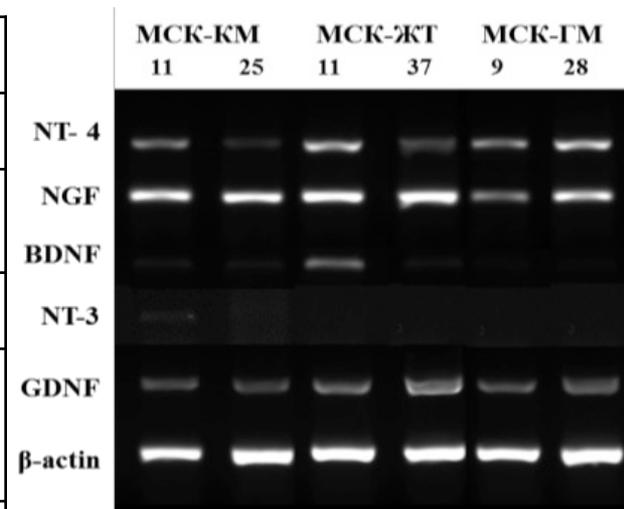
- астроцитов (GFAP) $4,8 \pm 1,5$ %;
- нейронов (β -тубулин III) $4,0 \pm 1,5$ %;
- олигодендроцитов (O4) $4,1 \pm 1,5$ %;
- предшественников олигодендроцитов (NG2) $1,3 \pm 0,5$ %.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ВЫЖИВАЕМОСТИ НСК МЫШИ ОТ ДОЗЫ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ



Экспрессия генов нейротрофинов в МСК, полученных из костного мозга (МСК-КМ), головного мозга (МСК-ГМ) и из жировой ткани (МСК-ЖТ)

Гены нейротрофинов	МСК-ГМ	МСК-КМ	МСК-ЖТ	
	Экспрессия генов, усл. ед			
	9-28 пассаж	11-25 пассаж	6-11 пассаж	37 пассаж
NGF	0,37±0,08	0,65± 0,11	0,79±0,05*	
BDNF	0,005 ±0,001	0,023 ±0,004 [•]	0,11±0,03*	0,018±0,001 *
NT4	0,30± 0,02	0,27± 0,0	0,29 ±0,03	0,14±0,05 [#]
GDNF	0,18± 0,01	0,17± 0,03	0,24 ±0,03	0,43±0,06 [#]



Цифрами указан номер пассажа клеток.

*- отличия между МСК-ГМ и МСК-ЖТ достоверны, $p < 0,05$;

• - отличия между МСК-ГМ и МСК-КМ достоверны, $p < 0,05$;

x - отличия между МСК-КМ и МСК-ЖТ достоверны, $p < 0,05$;

- отличия между МСК-ЖТ разных пассажей достоверны, $p < 0,05$.

АКТИВНОСТЬ НЕЙРОТРОФИНОВ В КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЕ, ПОЛУЧЕННОЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МСК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ МЫШИ

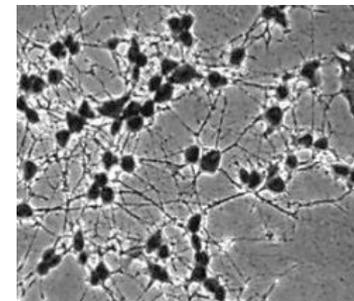
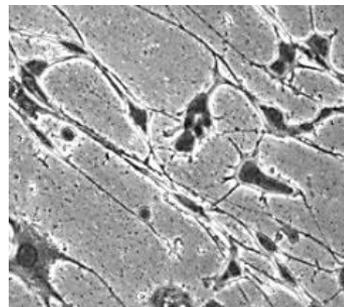
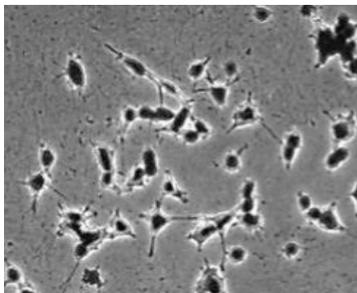
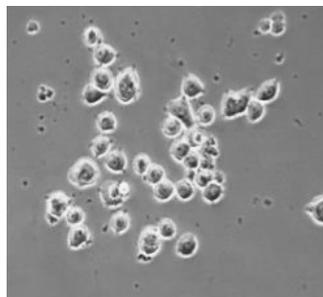
Кондиционированная среда	Доля дифференцированных клеток линии РС12, %		
	1 сутки	2 сутки	5 сутки
МСК-КМ	16,4	15,7	9,7
МСК-ГМ	10,0	15,2	7,0
МСК-ЖТ	9,7	15,3	55,6
NGF 50 нг/мл	25,8	-	96,5
Контроль	0	0	1,6

КОНТРОЛЬ

КС МСК-КМ

КС МСК-ЖТ

NGF 50 нМ



Характеристика МСК из разных тканей мышей линии C57BL/6 по секреции ряда цитокинов

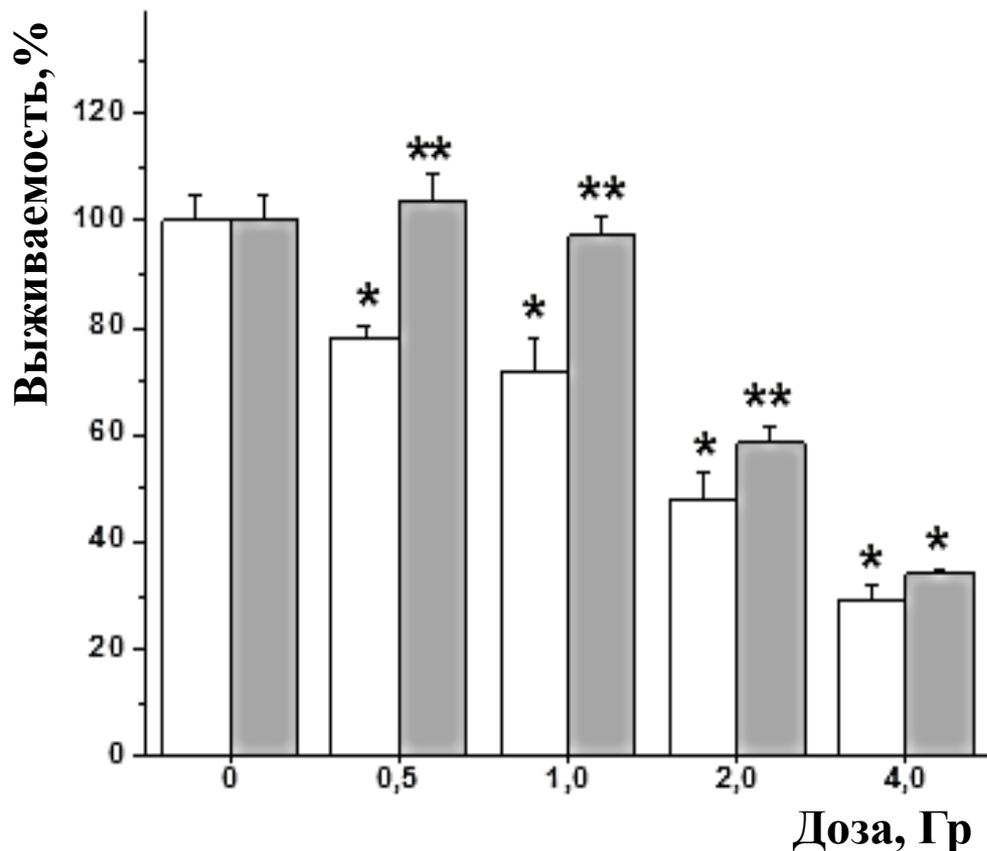
Цитокины	МСК-ГМ	МСК-КМ	МСК-ЖТ	
	9-28 пассаж	11-25 пассаж	6-11 пассаж	37 пассаж
	Концентрация цитокинов, пг/мл			
VEGF	145±15	561±59*	853±150*	-
HGF	2240±80	523±49* ^x	1760±100	-
IL6	670±10	110±15* ^x	422±50*	-
TGFβ	409±36	286±35 ^x	70±12*	-
G-CSF	58±12	10±5* ^x	0	-
FGF	0	0	0	-
IL10	0	0	0	-

*- отличия между МСК-ГМ и МСК-ЖТ достоверны, $p < 0,05$;

° - отличия между МСК-ГМ и МСК-КМ достоверны, $p < 0,05$;

^x - отличия между МСК-КМ и МСК-ЖТ достоверны, $p < 0,05$.

Влияние кондиционированной среды МСК из жировой ткани на выживаемость НСК после действия γ -излучения



Кондиционированная среда составляла 25% от общего объема среды.

По оси ординат – выживаемость, проценты от контроля; по оси абсцисс – доза облучения, Гр . Представлены средние значения \pm ошибка среднего.

*- отличие от контрольной культуры достоверно, $p < 0,05$;

** - отличие от облученных культур достоверно, $p < 0,05$; $n = 3$.

Выводы

1. Показана высокая чувствительность НСК мышцы к действию γ -излучения.
2. При сравнении экспрессии генов нейротрофинов NGF, BDNF, NT4 и GDNF в МСК из костного мозга, головного мозга и из жировой ткани наиболее высокий уровень экспрессии обнаружен в МСК из жировой ткани. В этих МСК уровень экспрессии генов BDNF и NT4 снижался при длительном культивировании, а GDNF возрастал.
3. В культуральной среде, кондиционированной МСК из жировой ткани мышцы, обнаружена высокая активность нейротрофинов, высокое содержание цитокинов IL6, HGF, TGF β и VEGF и отсутствие цитокинов G-CSF, FGF и IL10.
4. Обнаружено повышение выживаемости НСК при культивировании в присутствии кондиционированной среды МСК из жировой ткани мышцы после действия гамма-излучения.