

© Коллектив авторов, 2016
УДК 611.428:616.71-089.843:599.323.4

*И.В.Майбородин¹, В.А.Матвеева¹, Р.В.Маслов², Н.В.Оноприенко³, И.В.Кузнецова¹,
Г.А.Частикин¹, А.А.Аникеев¹*

НЕКОТОРЫЕ РЕАКЦИИ РЕГИОНАРНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРЫС ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ В ДЕФЕКТ КОСТНОЙ ТКАНИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, АДсорбированных на ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЕ

¹ Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А.И.Шевела), Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск; ² кафедра пародонтологии стоматологического факультета (зав. — проф. О.О.Янушевич), Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова; ³ кафедра акушерства и гинекологии (зав. — проф. И.О.Маринкин), Новосибирский государственный медицинский университет

У крыс-самцов 6-месячного возраста инбредной линии Wag (n=62) методами флюоресцентной микроскопии изучены реакции регионарных лимфатических узлов, обусловленные имплантацией аутологичных мультипотентных стромальных клеток костномозгового происхождения (АМСККП) для ускорения заживления дефекта кости нижней челюсти. После введения в участок повреждения кости трансплантата из полигидроксиалканата с адсорбированными АМСККП с трансфицированным геном зеленого флюоресцентного белка (GFP) в лимфоидных узелках поднижнечелюстных лимфатических узлов появляются многочисленные крупные макрофаги с множеством овальных светящихся включений в цитоплазме. Численность таких макрофагов нарастает в течение 2 нед после операции, а далее начинает уменьшаться. Видимо, введенные таким способом АМСККП частично поглощаются макрофагами. При разрушении структур, сформированных из АМСККП, детрит также фагоцитируется макрофагами. В том и другом случае эти макрофаги оказываются в герминативных центрах лимфоидных узелков лимфатических узлов, где возможна индукция иммунной реакции против ДНК и GFP.

Ключевые слова: костная ткань, мультипотентные стромальные клетки, лимфатические узлы, макрофаги

Несмотря на развитие травматологии и ортопедии, полное восстановление костных тканей является проблематичным, поскольку большие дефекты не могут спонтанно заживать. Использование стволовых клеток все больше расширяется с надеждой на успех терапевтических методов лечения ран и травм, на которые невозможно эффективно воздействовать современными хирургическими методами [5, 6, 8].

Красный костный мозг содержит прогениторные клетки (мультипотентные стромальные), способные к дифференцировке в костную, хрящевую и другие виды соединительной ткани. Это позволяет широко применять такие клетки для ускорения регенерации костей [1, 5, 10].

Имеются данные об эффективности использования клеточных технологий в стоматологии,

травматологии и хирургии. Однако отсутствуют результаты исследования лимфатических узлов после указанных способов воздействия на репаративную регенерацию костной ткани, тогда как именно эти органы являются маркером выраженности воспалительного процесса в регионе, по их изменениям можно оценивать результативность проведения лечебных мероприятий, предсказывать развитие многих осложнений, а значит, и успешно принимать меры по их профилактике.

Цель настоящей работы — исследование изменений регионарных лимфатических узлов при имплантации аутологичных мультипотентных стромальных клеток костномозгового происхождения (АМСККП), адсорбированных на матриксе из полигидроксиалканата (ПГА), для ускорения регенерации дефекта кости нижней челюсти.

Сведения об авторах:

Майбородин Игорь Валентинович (e-mail: imai@mail.ru), *Матвеева Вера Александровна*, *Кузнецова Ирина Владимировна*, *Частикин Геннадий Анатольевич*, *Аникеев Анатолий Анатольевич*, лаборатория стволовой клетки, Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

Маслов Роман Владимирович, кафедра госпитальной пародонтологии, стоматологический факультет, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

Оноприенко Наталья Валентиновна, кафедра акушерства и гинекологии, Новосибирский государственный медицинский университет, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

Материал и методы. Эксперименты проведены на 62 самцах крыс 6-месячного возраста инбредной линии Wag массой 180–200 г. Все манипуляции с животными осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г.; приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13 ноября 1984 г.).

АМСККП выделяли, вымывая костный мозг из эпифизов бедренных костей, полученную суспензию клеток помещали в пластиковые флаконы (Nunk, Дания), через 48 ч после эксплантации костного мозга неприкрепившиеся клетки сливали. Прикрепившиеся клетки культивировали в среде α -MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biolog, Россия) при 37 °C в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂ в условиях насыщенной влажности. Среду сменяли через каждые 3 сут. При субкультивировании монослойную культуру расщипывали с плотностью 1000–5000 клеток/см² (в зависимости от ростовых свойств используемой эмбриональной сыворотки), использовали стандартные растворы Версена и трипсина. Физические, морфологические, фенотипические признаки и дифференцировочный потенциал полученных клеток соответствовали таковым для АМСККП, которые были определены и описаны ранее [3].

АМСККП 2-го пассажа, полученные от крысы указанной линии, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., США), содержащей ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), под контролем промотора цитомегаловируса и ген устойчивости к неомицину под контролем промотора вируса SV40, необходимого для последующей селекции с использованием генетина G418 (pEGFP-N1; Clontech Laboratories Inc., США). Подробный протокол трансфекции и способы оценки экспрессии введенного гена GFP в АМСККП изложены ранее [3].

ПГА (сополимер из 85% полигидроксипропаноата и 15% гидроксиадипата) в виде матриц холодного прессования (авторское название) диаметром и высотой 2 мм был предоставлен для исследования Институтом биофизики СО РАН (г. Красноярск). Полимер до адсорбции АМСККП стерилизовали в забуференном физиологическом растворе для культур клеток в автоклаве при 120 °C, давлении в 1 атм в течение 20 мин. Непосредственно перед введением приготовленный для имплантации фрагмент матрикса из ПГА для пассивной адсорбции клеток погружали в суспензию АМСККП в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл суспензии) на 2 ч в связи с тем, что живые клетки прикрепляются к любому твердому субстрату.

Под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной при соблюдении правил асептики и антисептики после обработки кожи спиртом скальпелем делали разрез кожи длиной 1,5–2 см по нижнему краю нижней челюсти. Тупым способом при помощи распатора отслаивали жевательную мышцу и обнажали поверхность кости нижней челюсти в области ее угла. Стоматологическим бором делали круглое отверстие диаметром 2 мм в кости угла нижней челюсти, с полостью рта дефект кости не сообщался. После внедрения имплантата из ПГА и адсорбированными АМСККП или без клеток (контроль) послойно ушивали рану викрилом. Животных с признаками гнойно-воспалительных осложнений (абсцессы в подкожной основе) из эксперимента исключали.

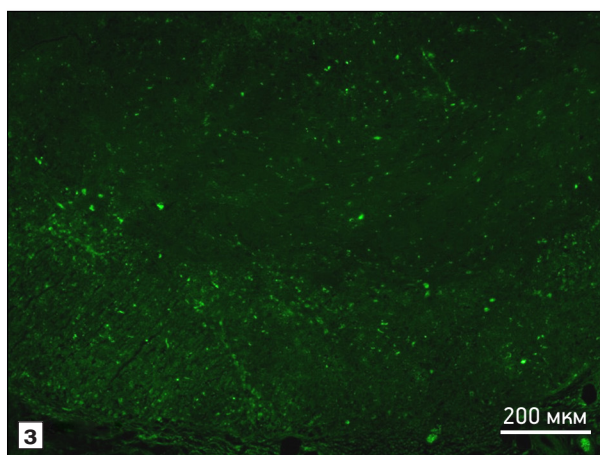
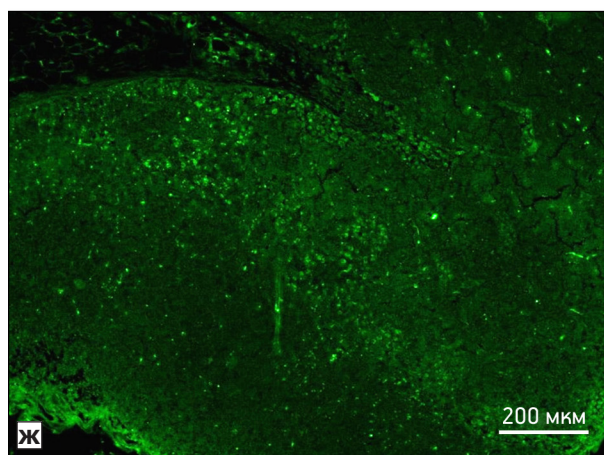
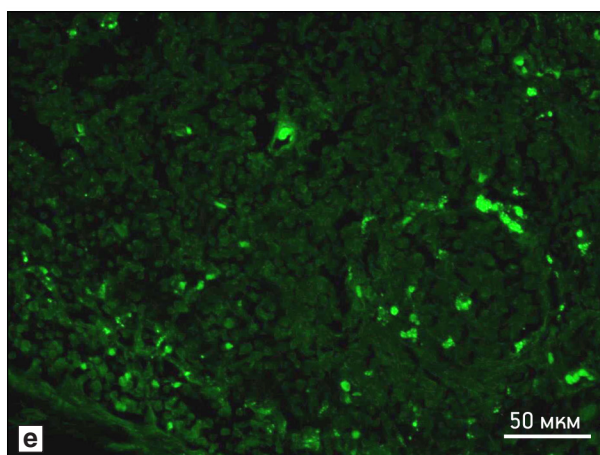
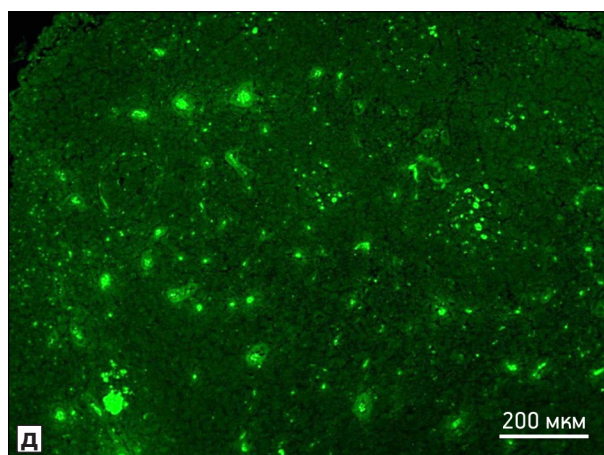
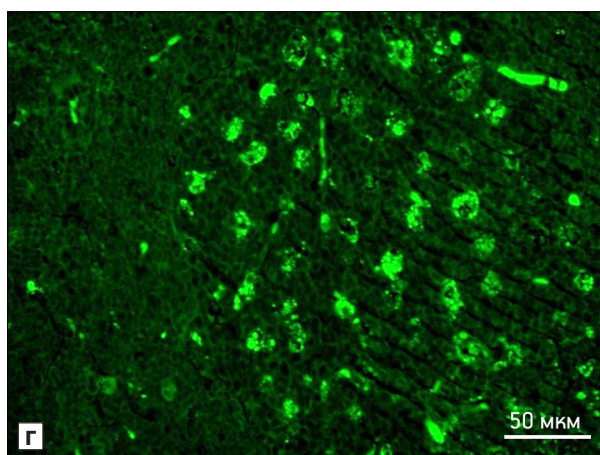
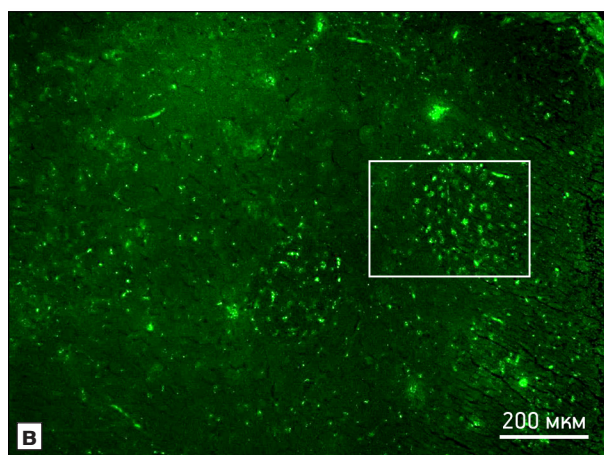
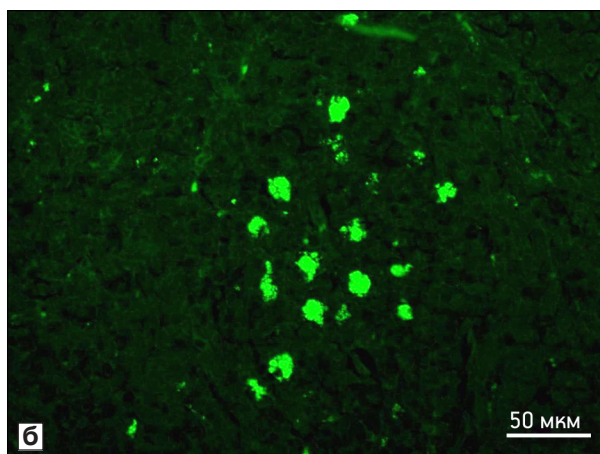
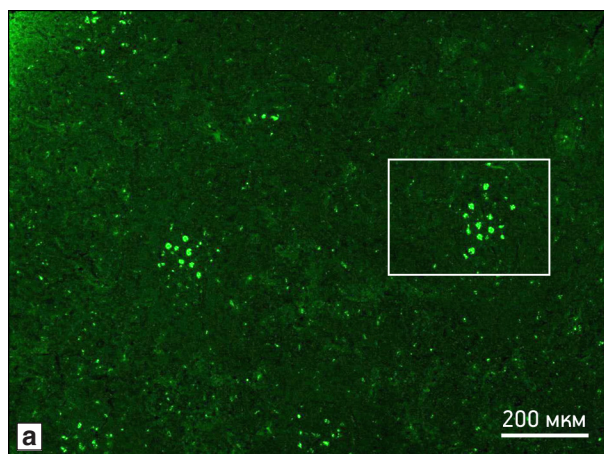
Спустя 1, 2, 3, 4 и 5 нед после операции поднижнечелюстные (регионарные к месту применения АМСККП) лимфатические узлы фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 ч, обезжизняли в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Неокрашенные срезы толщиной 5–7 мкм изучали под световым микроскопом Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз в режиме люминесценции с фильтром Alexa 488. На каждую временную точку исследования было использовано от 6 до 12 особей.

Результаты исследования. Через 1 нед после имплантации матрикса из ПГА и адсорбированными на нем АМСККП в (регионарных) поднижнечелюстных лимфатических узлах при исследовании в люминесцентном режиме микроскопа были обнаружены овальные скопления ярко светящихся очень крупных клеток, располагавшихся в лимфоидных узелках. Во флуоресцирующих клетках светилась не вся цитоплазма, а разные по размерам овальные гранулы, т. е. клетка представляла собой скопление ярко светящихся частиц с четкими ровными краями. Иногда было видно темное овальное ядро (рисунки, а, б).

Спустя 2 нед после применения имплантата из ПГА и АМСККП, в лимфатических узлах количество крупных светящихся клеток увеличилось. При этом возросло как количество их овальных скоплений, так и число клеток в них. По-прежнему в таких клетках светилась не вся

Поднижнечелюстные лимфатические узлы у крыс после имплантации в дефект кости нижней челюсти матрикса из полигидроксипропаноата (ПГА) с адсорбированными аутологичными мультипотентными стромальными клетками костномозгового происхождения (АМСККП) с трансфицированным геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) (а–е) и при имплантации матрикса из ПГА без АМСККП (ж, з).

а — 1 нед после операции, в корковом веществе — овальные скопления ярко светящихся крупных клеток; б — фрагмент рис., а. В цитоплазме светящихся клеток разные по размерам флуоресцирующие гранулы; в — 1 нед после операции. Обширные скопления крупных светящихся клеток в корковом веществе; г — фрагмент рис., в. Овальное скопление большого количества крупных клеток с различными по размерам флуоресцирующими гранулами, ярко светящиеся эритроциты в капиллярах; д — 3 нед после операции. Флуоресцирующие клетки, расположенные поодиночке; е — 5 нед после операции. Единичные крупные светящиеся клетки, расположенные только на периферии узелков; ж — 1 нед после имплантации. Единичные эритроциты во внутриузловых сосудах; з — 2 нед после операции. Единичные флуоресцирующие эритроциты. Неокрашенные срезы в люминесцентном режиме микроскопа с фильтром Alexa 488



цитоплазма, а множество различных по размерам гранул (см. рисунок, в, г).

К 3-й неделе площадь скоплений крупных светящихся клеток значительно уменьшилась, сократилось также и количество клеточных элементов в них. Вместе с этим в структурах лимфатических узлов резко возросло число флюоресцирующих клеток, расположенных поодиночке (см. рисунок, д).

Этот процесс сокращения размеров скоплений светящихся клеток и числа последних прогрессировал, и к 4, и 5 нед после операции можно было видеть не равномерное расположение этих крупных светящихся клеток в лимфоидных узелках, а их нахождение по периферии узелков. Также происходило постепенное уменьшение количества светящихся гранул в указанных крупных клетках (см. рисунок, е). Места овальных скоплений светящихся клеток имеют четкую границу и отличаются по плотности и фоновой окраске от окружающих тканей (см. рисунок, б, г, е).

В некоторых случаях хорошо видна аутофлюоресценция эритроцитов в сосудах, проходящих рядом со скоплениями крупных светящихся клеток и внутри них (см. рисунок, г, е).

В лимфатических узлах у животных после введения имплантата из ПГА без АМСККП светящиеся клетки отсутствовали как расположенные поодиночке, так и в виде скоплений, как в лимфоидных узелках, так и в других структурах лимфатического узла. В широком поле зрения были видны единичные небольшие светящиеся объекты, но это были эритроциты во внутриузловых сосудах (см. рисунок, ж, з).

Обсуждение полученных данных. Процессы репарации искусственно созданного дефекта костной ткани в области угла нижней челюсти у крыс как без какого-либо воздействия, так и при использовании имплантата из ПГА без АМСККП, подробно описаны нами ранее [2, 3].

В поднижнечелюстных лимфатических узлах после имплантации матрикса из ПГА с адсорбированными АМСККП с трансфицированным геном GFP в дефект кости нижней челюсти были обнаружены скопления ярко светящихся крупных клеток, которые располагались, по-видимому, в лимфоидных узелках, в пользу чего свидетельствует то, что такие скопления имеют шаровидную форму и расположены только в корковом веществе недалеко от капсулы.

Скорее всего, светящиеся клетки в лимфатических узлах являются макрофагами. Такое заключение можно сделать, основываясь на их

размерах, сходных с таковыми у макрофагов, неправильной форме, наличии множества разной величины включений, которые могут являться лизосомами с поглощенным флюоресцентным материалом, а также расположении в герминативных центрах лимфоидных узелков, где макрофагов очень много и имеются данные об их аутофлюоресценции в некоторых условиях [7, 13]. Однако в таком случае должна быть точно такая же флюоресценция макрофагов в лимфатических узлах у животных после введения имплантата из ПГА без АМСККП, но в данном случае в лимфатических узлах светятся только небольшие клетки (эритроциты, обладающие аутофлюоресценцией [4, 15]), а скопления крупных светящихся клеток независимо от формы полностью отсутствуют.

Можно предположить, что крупные светящиеся клетки в лимфатических узлах являются не просто макрофагами, а макрофагами, которые фагоцитировали введенные АМСККП или структуры, сформированные из таких клеток. Имеются данные, указывающие на возможность флюоресценции макрофагов за счет свечения фагоцитированного и метаболизированного материала в их гранулах [9, 11, 12].

В месте повреждения кости нижней челюсти с последующей имплантацией матрикса из ПГА с адсорбированными на нем АМСККП развивается асептическая воспалительная реакция, характеризующаяся поступлением в регионарные лимфатические узлы большого объема тканевого детрита. Несомненно, что вместе с этим детритом в лимфатические узлы поступают и часть введенных АМСККП, которые не все жизнеспособны. В лимфатических узлах макрофаги поглощают антигенный материал и, видимо, попавшие туда АМСККП вместе со светящимся белком GFP и их фрагменты. В таких случаях лизосомы макрофагов, в которых находится флюоресцентный белок, могут светиться при воздействии ультрафиолетового света так же, как и сами АМСККП с трансфицированным геном GFP. Не исключено и встраивание ДНК белка GFP в геном макрофагов, и накопление этого белка, но такая возможность маловероятна.

То, что макрофаги с поглощенным клеточным светящимся детритом сконцентрированы в лимфатических узлах в герминативных центрах лимфоидных узелков, можно объяснить с двух позиций. Во-первых, в герминативных центрах идут размножение, активация и дифференцировка клеток В-линии, которые в дальнейшем будут синтезировать антитела к определенным анти-

генам. Для запуска и успешного осуществления этого процесса необходимо присутствие макрофагов с данным антигеном. В герминативных центрах имеются множество макрофагов, которые могут поглощать антигены из окружающих тканей и, видимо, лимфы, проходящей по межузелковым синусам. Во-вторых, макрофаги могут фагоцитировать светящиеся клетки или вышедший из них при разрушении белок GFP из лимфы и затем или мигрировать в лимфоидные узелки для активации и запуска процесса пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов, или передавать антигены другим макрофагам, находящимся уже непосредственно в узелках. Существует возможность фагоцитирования АМСККП и продукта их распада в месте имплантации матрикса из ПГА, миграции макрофагов с антигеном в лимфатические узлы вместе с током лимфы и уже в них передачи антигенов фагоцитам герминативных центров.

Таким образом не исключено создание иммунной защиты против введенных АМСККП с трансфицированным геном GFP или самого светящегося белка. Не исключено, что после повторного введения клеток с трансфицированным геном GFP такие клеточные элементы будут очень быстро уничтожаться системой иммунитета, и из них никаких структур не будет формироваться.

Необходимо рассмотреть еще одну возможную причину свечения макрофагов. Известно, что эритроциты обладают аутофлюоресценцией [4, 15]. При моделировании повреждения кости нижней челюсти повреждаются многочисленные кровеносные сосуды, и эритроциты оказываются в тканях. В месте геморагий клетки крови поглощаются макрофагами (сидерофагами), кроме того, эритроциты из тканей поступают в регионарные лимфатические узлы, где также фагоцитируются макрофагами. Такое присутствие эритроцитов и продуктов их распада в лизосомах макрофагов может обусловить их флюоресценцию под воздействием ультрафиолетового облучения. Есть данные о флюоресценции макрофагов вследствие наличия в них гемосидерина [13, 14]. Однако при исследовании лимфатических узлов у животных в условиях использования имплантата из ПГА без АМСККП скопления светящихся макрофагов обнаружены не были.

В проведенном нами исследовании к окончанию времени наблюдения было отмечено постепенное уменьшение количества светящихся гранул в таких макрофагах. Введенные АМСККП постепенно замещаются собственными клетками

и структурами. Вследствие того, что структур, построенных из имплантированных АМСККП, становится все меньше, в лимфатических узлах сокращаются количество светящихся макрофагов, содержание светящихся гранул в них и интенсивность свечения.

Итак, после внедрения в участок повреждения кости нижней челюсти имплантата из ПГА и адсорбированными АМСККП с трансфицированным геном GFP в лимфоидных узелках регионарных лимфатических узлов появляются многочисленные крупные макрофаги с множеством овальных светящихся включений в цитоплазме. Численность таких макрофагов нарастает в течение 2 нед после операции, а далее начинает уменьшаться. Видимо, введенные таким способом АМСККП частично поглощаются макрофагами. При разрушении структур, сформированных из АМСККП, детрит также фагоцитируется макрофагами. В том и другом случае эти макрофаги оказываются в герминативных центрах лимфоидных узелков лимфатических узлов, где не исключена инициация иммунитета против ДНК и белка GFP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воложин А.И., Васильев А.Ю., Мальгинов Н.Н. и др. Использование мезенхимальных стволовых клеток для активизации репаративных процессов костной ткани челюсти в эксперименте // *Стоматология*. 2010. Т. 89, № 1. С. 10–14.
2. Майбородин И.В., Матвеева В.А., Колесников И.С. и др. Регенерация поврежденной кости нижней челюсти крыс после использования аутологичных стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения, адсорбированных на фибриновом густке // *Морфология*. 2011. Т. 140, вып. 6. С. 79–85.
3. Майбородин И.В., Шевела А.И., Шеплев Б.В. и др. Применение биodeградируемых полигидроксиалканоев после повреждения кости нижней челюсти в эксперименте // *Клин. стоматол.* 2010. № 4. С. 54–57.
4. Campo J.J., Aponte J.J., Nhabomba A.J. et al. Feasibility of flow cytometry for measurements of *Plasmodium falciparum* parasite burden in studies in areas of malaria endemicity by use of bidimensional assessment of YOYO-1 and autofluorescence // *J. Clin. Microbiol.* 2011. Vol. 49, № 3. P. 968–974.
5. Chanda D., Kumar S., Ponnazhagan S. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton // *J. Cell Biochem.* 2010. Vol. 111, № 2. P. 249–257.
6. Clines G.A. Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis // *Curr. Opin. Organ. Transplant.* 2010. Vol. 15, № 1. P. 73–78.
7. Duan M., Li W.C., Vlahos R. et al. Distinct macrophage subpopulations characterize acute infection and chronic inflammatory lung disease // *J. Immunol.* 2012. Vol. 189, № 2. P. 946–955.

8. Galle J., Bader A., Hepp P. et al. Mesenchymal stem cells in cartilage repair: state of the art and methods to monitor cell growth, differentiation and cartilage regeneration // *Curr. Med. Chem.* 2010. Vol. 17, № 21. P. 2274–2291.
9. Iida T. Pathophysiology of macular diseases — morphology and function // *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 2011. Vol. 115, № 3. P. 238–275.
10. Kallai I., Lenthe van G.H., Ruffoni D. et al. Quantitative, structural, and image-based mechanical analysis of nonunion fracture repaired by genetically engineered mesenchymal stem cells // *J. Biomech.* 2010. Vol. 43, № 12. P. 2315–2320.
11. Lei L., Tzekov R., Tang S., Kaushal S. Accumulation and autofluorescence of phagocytized rod outer segment material in macrophages and microglial cells // *Mol. Vis.* 2012. Vol. 18. P. 103–113.
12. Luhmann U.F., Robbie S., Munro P.M. et al. The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009. Vol. 50, № 12. P. 5934–5943.
13. Mitchell A.J., Pradel L.C., Chasson L. et al. Technical advance: autofluorescence as a tool for myeloid cell analysis // *J. Leukoc. Biol.* 2010. Vol. 88, № 3. P. 597–603.
14. Potter K.A., Simon J.S., Velagapudi B., Capadona J.R. Reduction of autofluorescence at the microelectrode-cortical tissue interface improves antibody detection // *J. Neurosci. Methods.* 2012. Vol. 203, № 1. P. 96–105.
15. Watson J. Suppressing autofluorescence of erythrocytes // *Biotech. Histochem.* 2011. Vol. 86, № 3. P. 207.

Поступила в редакцию 24.06.2015
Получена после доработки 05.11.2015

SOME REACTIONS OF THE REGIONAL LYMPH NODES OF RATS AFTER IMPLANTATION OF MULTIPOTENT STROMAL CELLS ADSORBED ON POLYHYDROXYALKANOATE INTO A BONE TISSUE DEFECT

*I.V.Maiborodin¹, V.A.Matveyeva¹, R.V.Maslov²,
N.V.Onopriyenko³, I.V.Kuznetsova¹, G.A.Chastikin¹,
A.A.Anikeyev¹*

The reactions of the regional lymph nodes, caused by implantation of the autologous multipotent stromal cells of bone marrow origin (AMSCBMO) to accelerate the healing of mandibular bone defect were studied by fluorescent microscopy in inbred male Wag rats aged 6 months (n=62). After the introduction of polyhydroxyalkanoate transplant containing adsorbed AMSCBMO with a transfected Green Fluorescent Protein (GFP) gene into a damaged bone area, the lymphoid nodules in submandibular lymph nodes demonstrated the appearance of numerous large macrophages containing multiple oval fluorescent inclusions in the cytoplasm. The number of these macrophages increased within 2 weeks after surgery and then began to decline. Apparently, AMSCBMO introduced in this way, were partially absorbed by macrophages. After destruction of the structures formed from AMSCBMO, the debris was also phagocytized by macrophages. In either case, these macrophages appeared in the germinal centers of lymphoid nodules in lymph nodes, where the induction of immune responses against DNA and GFP protein was probable.

Key words: *bone tissue, multipotent stromal cells of bone marrow origin, lymph nodes, macrophages*

¹ The Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAS Siberian Branch, Novosibirsk; ² Department of Periodontology, Stomatologic Faculty, A.I.Yevdokimov Moscow State Medico-Stomatologic University; ³ Department of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk State Medical University