

УДК 617.-089.843

© Колектив авторів, 2012.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАГОСННЯ СТРЕСОВИХ ВИРАЗОК ПІД ВПЛИВОМ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ

**І.С. Нікольський, С.М. Галицька, Я.-М.О. Семенова, Д.О. Зубов, Л.І. Тарануха,
В.В. Нікольська, Н.А. Лисиця, Л.І. Остапченко**

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, інститут генетичної та регенеративної медицини
АМН України (директор – академік НАМН України Г.М. Бутенко), м. Київ.*

EXPERIMENTAL RESEARCH OF BONE MARROW MSC INFLUENCE ON STRESS STOMACH ULCERS
I.S. Nikolsky, S.M. Halytska, Y.-M.O. Semenova, D.O. Zubov, L.I. Taranukha, V.V. Nikolskaya,
N.A. Lisitsa, L.I. Ostapchenko

SUMMARY

MSC influence on stress stomach ulcers was investigated. The model of water-immersion stress was used. The prolonged stress resulted to more stomach ulcers than the acute stress. Moreover, thymic and spleen cellularity was decreased and leukocyte number was increased at prolonged stress. Bone marrow MSC transplantation 24 hours prior to last stress in model of prolonged stress decreased stomach ulcers and stress immunological changes.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЖИВЛЕНИЯ СТРЕССОВЫХ ЯЗВ ПОД ВЛИЯНИЕМ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА**

**И.С. Никольский, С.Н. Галицкая, Я.-М.А. Семенова, Д.А. Зубов, Л.И. Тарануха, В.В. Никольская,
Н.А. Лисица, Л.И. Остапченко**

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние МСК на образование язв желудка при стрессе у крыс. Использовали модель иммобилизационного водно-иммерсионного стресса. При пролонгированном стрессе наблюдается более выраженное язвообразование, чем при остром, а также снижение клеточности тимуса, селезенки и увеличение количества лейкоцитов в крови. Введение МСК костного мозга за 24 часа до последнего воспроизведения стресса в модели пролонгированного стресса существенно снижает язвообразования и вызванные стрессом количественные клеточные изменения в иммунной системе.

Ключові слова: мультипотентні стромальні клітини, стрес, шлункові виразки, імунологія.

Незважаючи на суттєві сучасні досягнення у вивченні етіології і патогенезу виразкової хвороби шлунка широка розповсюдженість цього захворювання, часте торпідне протікання і рецидивування робить виразкову хворобу актуальною проблемою і в теперішній час [2]. Одним із найбільш перспективних наукових напрямків у цьому відношенні є дослідження ролі стресових процесів, реалізація котрих часто призводить до утворення виразок, справедливості чого для експериментальних умов відома ще з часів Г.Сельє [4]. Потребують також вдосконалення методи лікування та профілактики, в основу яких покладені нові підходи, що засновані на останніх досягненнях біології та медицини. Одним з таких сучасних напрямків є регенеративна медицина з використанням клітинних технологій, в тому числі мультипотентних стромальних клітин (МСК).

Здатність МСК до міграції в патологічні вогнища, мультилінійне диференціювання, експресія великої кількості адгезивних молекул, що обумовлює можливість мультиорганного хомінгу, імуномодельючі, головним чином толерогенні, властивості [11], і в решті решт певний вплив на

ендокринний статус, визначають перспективність дослідження впливу цих клітин на утворення стресових виразок шлунку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У досліджах використовували самців білих нелінійних щурів масою 220-260 г. Експериментальні виразки шлунку у піддослідних тварин викликали методом іммобілізаційного водоімерсійного стресу [12]. Згідно даної моделі, іммобілізованих тварин витримували 3 години у воді (23°C), що доходила до рівня мечоподібного відростка. За добу до проведення дослідів тварин не годували та давали воду ad libidum.

Модель стресу відтворювали у двох варіантах: гострий та пролонгований стрес.

Для отримання гострого процесу стрес відтворювали одноразово. Для моделювання пролонгованого стресу щурів стресували тричі через 24 години, потім через 96 годин ще раз відтворювали стрес. За добу до проведення дослідів тварин не годували та давали воду ad libidum.

МСК ізолювали механічним методом із строми кісткового мозку стегнової кістки щурів. Адгезуючу

до пластику фракцію клітин, культивували при 37°C та 5% атмосфері CO₂ і пересівали до 10 пасажу (поживне середовище DMEM/F12 + 10% ETC + 4 нг/мл основного фактору росту фібробластів + 0,5 мг/мл L-глутаміну + 1 мкг/мл фунгізону + 50 мкг/мл гентаміцину). За необхідністю зберігання культивовані МСК заморожували за програмою у рідкому азоті.

МСК вводили за 24 години до гострого стресу або останнього відтворення стресової реакції при моделюванні пролонгованого стресу по 4x10⁶ клітин на тварину. Експериментальні дослідження починали проводити відразу після припинення дії стресових факторів.

Для огляду виразкових уражень, шлунок промивали 2% розчином формаліну та залишали у цьому розчині на 10 хв. Після цього його розрізали по великому викривленню та підраховували кількість і площу виразок.

Для визначення клітинності лімфоїдних органів, тимус і селезінку важили а, клітини суспендували у поживному середовищі. Кількість каріоцитів тимусу та селезінки і кількість лейкоцитів периферичної крові підраховували в 3% розчині оцтової кислоти в камері Горяєва.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою критерію Ст'юдента та

непараметричного критерію Вілкоксона–Ман–Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розуміння стресу як вплив факторів, що загрожують нормальному функціонуванню або, навіть, існуванню організму пояснюється його генералізованою відповіддю, в якій нервова, ендокринна та імунна системи щільно взаємодіють та у фізіологічному варіанті забезпечують адаптацію до стресуючих стимулів [6].

Після відтворенні гострого та пролонгованого стресу огляд слизової оболонки шлунку виявляв дві форми виразкових уражень у дослідних тварин: перша – з великою кількістю малих виразок (біля 0,5 мм²), друга – з наявністю великих за площею виразок (більше 4 мм²) та меншою кількістю малих виразок. При цьому перша форма виразкових уражень переважала в групах тварин з гострим стресом (91% випадків) та у стресованих тварин після введення МСК (всі тварини). Друга форма переважала у тварин після пролонгованого стресу (67% випадків).

Як можна побачити з таблиці 1, площа виразкових уражень шлунку щурів після пролонгованого стресу була суттєво більша в порівнянні з такою у тварин після гострого стресу, а кількість виразкових уражень у тварин після пролонгованого стресу мала тенденцію до зростання.

Таблиця 1

Площа (мм²) та кількість виразкових уражень шлунка у щурів після гострого та пролонгованого стресу

Статистичні показники	Площа виразкових уражень шлунка		Кількість виразкових уражень шлунка	
	при гострому стресі	при пролонгованому стресі	при гострому стресі	при пролонгованому стресі
M	10,17	20,45	18,7	25,3
±m	1,19	3,92	2,2	5,0
n	11	6	11	6
ГК	4,92- 17,2	10 - 32,66	10 - 33	15 – 46
p(t,U)	-	< 0,05	-	>0,05

Одним з важливих патогенетичних механізмів, який може впливати на утворення і загоєння виразок може бути функціональна неспроможність фібробластів слизової оболонки шлунка [5], а також цитотоксичний вплив на ці клітини природних кілерів та Т-лімфоцитів, пов'язаний зі зміною ультраструктури фібробластів та фібробластоїдних клітин [3]. Відомо також, що присутні в дорослому шлунковому епітелії МСК відіграють важливу роль в оновленні цієї тканини [9, 10]. Окремі літературні дані підтверджують ефективність трансплантації МСК при виразках шлунку та інших пошкодженнях шлункового епітелію [1], що разом узятє аргументувало перспективність вивчення можливості використання МСК для загоєння виразок.

Введення МСК впливало на виразкоутворення в залежності від варіанту стресу. У тварин з гострим стресом МСК суттєво не впливали на загоєння виразок шлунка. Але, як можна побачити з таблиці 2, введення МСК при пролонгованому стресі призводило до значного зниження кількості та площі виразок.

Загальновідомими наслідками стресу є зниження відносної ваги та клітинності тимусу та селезінки, а також лейкоцитоз [13]. Дійсно, відтворення пролонгованого стресу приводило до суттєвого зниження відносної ваги тимусу та селезінки (з 0,093 до 0,069% та з 0,499 до 0,366% відповідно, p<0,05), та як можна побачити з таблиці 3, до зменшення клітинності тимусу і селезінки. В результаті введення МСК клітинність тимусу суттєво збільшувалась.

Таблиця 2

Площа (мм²) та кількість виразкових уражень шлунка у щурів після пролонгованого стресу при введенні МСК

Статистичні показники	Площа виразкових уражень шлунка		Кількість виразкових уражень шлунка	
	без введення МСК	з введенням МСК	без введення МСК	з введенням МСК
M	20,45	4,37	25,3	8,0
±m	3,92	1,67	5,0	3,0
n	6	6	6	6
ГК	10 - 32,66	0 - 11,03	15 - 46	0 - 19
p(t,U)	-	< 0,05	-	< 0,05

Таблиця 3

Клітинність тимусу та селезінки (10⁶ кл/ мг органу) щурів після пролонгованого стресу при введенні МСК

Статистичні показники	Клітинність тимусу			Клітинність селезінки		
	інтактні тварини	без введення МСК	з введенням МСК	інтактні тварини	без введення МСК	з введенням МСК
M	2,08	1,27	1,60	0,43	0,19	0,29
±m	0,20	0,32	0,15	0,05	0,06	0,06
n	14	6	6	14	6	6
ГК	1,24 – 4,27	0,84 – 2,88	1,23 – 2,02	0,18 – 1,02	0,05 – 0,39	0,10 – 0,44
p(t,U)	-	< 0,05	>0,05	-	< 0,05	>0,05
p(t)	-	-	>0,05	-	-	>0,05
p(U)	-	-	< 0,05	-	-	>0,05

Таблиця 4

Кількість лейкоцитів (/мкл) в периферичній крові щурів після пролонгованого стресу при введенні МСК

Статистичні показники	Кількість лейкоцитів		
	інтактні тварини	без введення МСК	з введенням МСК
M	14300	23700	17200
±m	2000	3100	1000
n	8	6	6
ГК	8400 - 26800	13500 - 32300	15200- 22000
p(t)	-	< 0,05	>0,05
p(U)	-	< 0,05	=0,05
p(U)	-	-	>0,05

Пролонгований стрес призводив також до суттєвого збільшення кількості лейкоцитів у периферичній крові мишей, а введення МСК дещо знижувало ці показники (таблиця 4).

ВИСНОВОК

Таким чином, при пролонгованому стресі спостерігається більш виражене виразкоутворення, ніж при гострому, а також зниження клітинності тимусу, селезінки та збільшення кількості лейкоцитів

в крові. Введення МСК кісткового мозку за 24 години до останнього відтворення стресу в моделі пролонгованого стресу суттєво знижує виразкоутворення та викликані стресом кількісні клітинні зміни в імунній системі, що пов'язано, мабуть, з однієї сторони, з безпосереднім регенераторним впливом МСК на слизову оболонку шлунку, а з іншої, з відомою імуносупресивною дією МСК.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аскарлов М. Б. Трансплантация аутологичных клеток костного мозга для лечения длительно незаживающих язв желудка : автореф. дис. на соискание уч. степени д. мед. наук. – Москва, 2009. – 20 с.
2. Кузьменко Л. І. Регуляція секреторних процесів у паріентеральних клітинах при різних патологіях шлунка / Л. І. Кузьменко, О. В. Богданова, Л. І. Остапченко // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, № 4. – С. 80–88.
3. Логинов А. С. Цитотоксический эффект лимфоцитов в слизистой оболочке желудка / А. С. Логинов, Р. Б. Гудкова, В. Б. Потапова // Иммунология. - 1992. - № 2. – С. 11-14.
4. Селье Г. На уровне целого организма / Селье Г. – М: “Наука”, 1972. – 122 с.
5. Ультраструктурные особенности фибробластов слизистой оболочки желудка при длительно не рубцующейся язве / А. С. Логинов, В. Б. Потапова, Г. Н. Соколова, В. В. Ульянова // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1996. - № 4. – С. 33-38
6. Хаитов Р. М. Иммунитет и стресс / Р. М. Хаитов, В. П. Лесков // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 8. – С. 1060-1072.
7. Barry I. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization / I. Barry, J. M. Murphy // *Int.J.Biochem Cell Biol.* – 2004. – V. 36. – P. 568-584.
8. Bhatia V. Stress and the gastrointestinal tract / V. Bhatia, R. K.Tandon // *J.Gastroenterol.Hepatol.* – 2005. – Vol. 20, № 3. – P. 332-339.
9. Bjercknes M. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium / M. Bjercknes, H. Cheng // *Am. J. Gastrointest. Liver Phisiol.* – 2002. – V. 283, № 3. – P. 767-777.
10. Identification of a bone marrow-derived mesenchymal progenitor cell subset that can contribute to the gastric epithelium / T. Okumura, S. S. W. Wang, S. Takashi [et al] // *Laboratory Investigation.* – 2009. – V. 89. – P. 1410-1422.
11. Ohta Y. Protective effect of coadministered superoxide dismutase and catalase against stress-induced gastric mucosal lesion / Ohta Y., Nishida K. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2003. – V.30, №8. – P.545-550.
12. Mesenchimal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome / Chapel A., Bertho J. M. [et al.] // *J. Gene Med.* – 2003. – Vol. 5, № 4. – P. 1028-1038.
13. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune response in mice / Bowers S.L., Bilbo S.D., Dhabhar F.S., Nelson R.J. // *Brain. Behav. Immun.* – 2008. – V. 22, №1. – P. 105-113.