

УДК 616-005.6: 57.089.6

МАКРОФАГИ СО СВЕЧЕНИЕМ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ТРАНСФИЦИРОВАННЫМ ГЕНОМ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩЕГО БЕЛКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Майбородин И.В., Матвеева В.А., Маслов Р.В., Оноприенко Н.В.,
Кузнецова И.В., Частикин Г.А.

*Центр новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, e-mail: imai@mail.ru*

Методами флюоресцентной световой микроскопии изучали реакции регионарных лимфатических узлов крыс, обусловленные имплантацией аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения (АММСККП) для ускорения регенерации дефекта кости нижней челюсти. После внедрения в участок повреждения кости нижней челюсти полигидроксиалканоеата с адсорбированными АММСККП с трансфицированным геном GFP в лимфоидных узелках субмандибулярных лимфатических узлов появляются многочисленные крупные макрофаги с множеством овальных светящихся включений в цитоплазме. Численность таких макрофагов нарастает в течение 2 недель после операции, а далее начинает уменьшаться. Видимо, введенные таким способом АММСККП частично поглощаются макрофагами. При разрушении структур, сформированных из АММСККП, 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.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, лимфатические узлы, макрофаги, флюоресценция макрофагов

THE MACROPHAGES WITH THE LUMINESCENCE IN LYMPH NODES AFTER INTRODUCTION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS WITH THE TRANSFECTED GENE OF GREEN FLUORESCING PROTEIN IN EXPERIMENT

Mayborodin I.V., Matveeva V.A., Maslov R.V., Onoprienko N.V.,
Kuznetsova I.V., Chastikin G.A.

*The Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
The Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, e-mail: imai@mail.ru*

The reactions of rat regional lymph nodes, caused by implantation of the autologous multipotent mesenchymal stromal cells of a bone marrow origin (AMMSCBM) for acceleration of bone defect regeneration in bottom jaw experiment were studied by methods of fluorescent light microscopy. After introduction in an injury site of a bottom jaw bone of polyhydroxyalkanoate with adsorbed AMMSCBM with a transfected GFP gene the numerous large macrophages with a set of oval fluorescent inclusions in cytoplasm appear in lymph nodules of submandibular lymph nodes. The number of such macrophages increases within 2 weeks after operation, and further starts decreasing. Probably, entered via such way the AMMSCBM partially are phagocytized by macrophages. At destruction of the structures created from AMMSCBM, debris also are phagocytized by macrophages. In that and other case these macrophages appear in the germinative centers of lymph nodules in lymph nodes where initiation of immunity reactions against DNA and same GFP isn't excluded.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, lymph nodes, macrophages, macrophage fluorescence

Несмотря на развитие травматологии и ортопедии, полное восстановление костных тканей является проблемным, поскольку большие дефекты не могут спонтанно заживать. Использование стволовых клеток – это регенеративная биология и восстановительная медицина, являющиеся все более расширяющимися областями исследования с надеждой на успех терапевтических методов лечения ран и травм, на которые невозможно эффективно воздействовать современными хирургическими методами [5, 6].

В научной литературе имеется множество данных об эффективности использования прогениторных клеток (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костномозгового происхождения (АММСККП)),

в стоматологии, травматологии и хирургии [1, 5]. Однако полностью 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 точно оценивать результативность проведения тех или иных лечебных мероприятий, предсказывать развитие многих осложнений, а значит, и успешно принимать меры по их профилактике.

В связи с вышеизложенным была определена **цель исследования:** Установить реакции регионарных лимфатических узлов крыс, обусловленные имплантацией АММСККП в регионе лимфосбора.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на самцах крыс инбредной линии Wag весом 180–200 г возрастом 6 месяцев. 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.). На каждую точку исследования было использовано не менее 6 крыс (от 6 до 12 особей, всего 62 животных).

Получение и культивирование АММСККП, а также их физические, морфологические, фенотипические признаки и дифференцировочный потенциал соответствовал описанным нами ранее [3, 4]. АММСККП 2 пассажа трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1. Подробный протокол трансфекции и способы оценки экспрессии введенного гена GFP в АММСККП изложены в наших более ранних работах [4].

ПГА (сополимер из 85 % полигидроксibuтирата и 15 % гидроксивалериата) 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 АММСККП стерилизовали замоченными в забуференном физиологическом растворе для культур клеток в автоклаве при 120 °С, давлении в 1 атмосферу в течение 20 минут. Непосредственно перед внедрением приготовленный для имплантации фрагмент ПГА для пассивной адсорбции клеток погружали в суспензию АММСККП в культуральной среде ($1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл суспензии) на 2 часа.

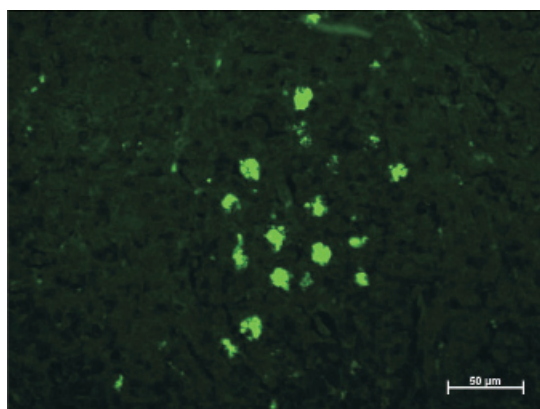
Модель дефекта костной ткани в эксперименте [2, 3]. Под общим ингаляционным эфирным наркозом, в условиях чистой операционной, при соблюдении правил асептики и антисептики, после обработки кожи спиртом скальпелем производили разрез кожи длиной 1,5–2 см по нижнему краю нижней челюсти.

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 ПГА с адсорбированными АММСККП или без клеток (контроль) послойно ушивали рану викрилом.

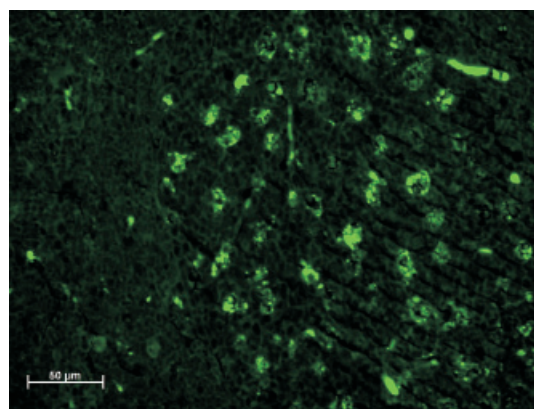
Спустя 1, 2, 3, 4 и 5 недель после операции субмандибулярные (регионарные к месту применения АММСККП) лимфатические узлы фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 часов, обезвоживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Неокрашенные срезы толщиной 5–7 мкм изучали на световом микроскопе Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз в режиме люминесценции с фильтром Alexa 488.

Результаты исследования и их обсуждение

Через 1 неделю после имплантации ПГА с адсорбированными АММСККП в дефект нижнечелюстной кости в регионарных (субмандибулярных) лимфатических узлах при исследовании в отраженном ультрафиолетовом свете были найдены овальные скопления ярко светящихся клеток. Эти клетки были очень крупными, до 20 мкм в диаметре, и такие клетки располагались в лимфоидных узелках. Во флуоресцирующих клетках светилась не вся цитоплазма, а разные по размерам овальные гранулы, то есть клетка представляла собой скопление ярко светящихся частиц с четкими ровными краями. Размер этих гранул достигал 10 мкм. Иногда было видно темное овальное ядро (рис. 1, а).



а



б

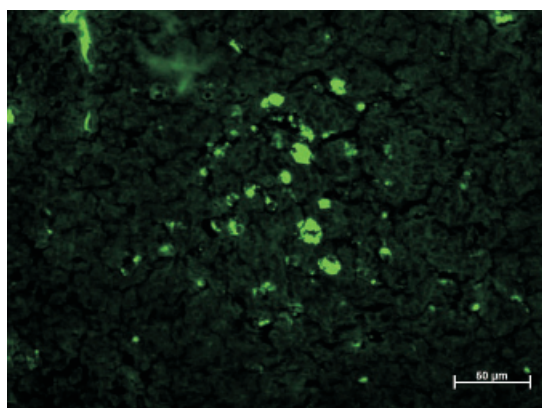
Рис. 1. Субмандибулярные лимфатические узлы крыс через 1 и 2 недели после имплантации ПГА с адсорбированными АММСККП с трансфицированным геном GFP в дефект кости нижней челюсти. Неокрашенные срезы в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром Alexa 488: а – через 1 неделю после операции в корковом веществе присутствуют овальные скопления ярко светящихся крупных клеток, которые достигают в размере 20 мкм. В их цитоплазме содержатся разные по размерам флуоресцирующие гранулы размером до 10 мкм, иногда видно темное овальное ядро; б – обширные скопления из крупных специфически светящихся клеток расположены в паренхиме коркового вещества спустя 2 недели после имплантации. Ткань овального скопления отличается по плотности и фоновой окраске от окружающих тканей и имеет четкую границу. Кроме того ярко светятся эритроциты во внутриузловых капиллярах

Спустя 2 недели после применения ПГА с АММСККП для воздействия на репарацию поврежденной нижней челюсти в лимфатических узлах количество крупных специфически светящихся клеток увеличилось. Причем увеличилось как число овальных скоплений таких объектов, так и число клеток в них. По-прежнему в таких клетках светилась не вся цитоплазма, а множество различных по размерам гранул (рис. 1, б).

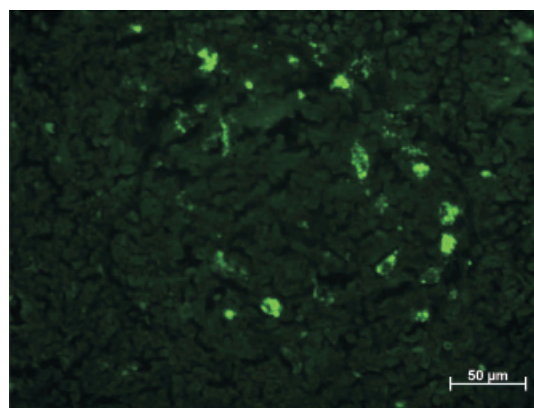
К следующему сроку наблюдения, к 3-й неделе, площадь скоплений крупных светящихся клеток значительно уменьшилась, также сократилось и количество кле-

точных элементов в них. Но вместе с этим резко возросло число флюоресцирующих клеток, расположенных поодиночке в структурах лимфатических узлов (рис. 2, а).

Этот процесс сокращения размеров скоплений светящихся клеток и числа самих объектов со свечением в них прогрессировал и на 4 и 5 неделях. К этому времени можно отметить неравномерное расположение крупных светящихся клеток в лимфоидных узелках, а выстраивание таких объектов по периферии узелков. Также следует обратить внимание на постепенное уменьшение количества светящихся гранул в указанных крупных клетках (рис. 2, б).



а



б

Рис. 2. Субмандибулярные лимфатические узлы крыс спустя 3 и 4 недели после внедрения ПГА с адсорбированными АММСККП с трансфицированным геном GFP в мандибулярный дефект. Неокрашенные срезы в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром Alexa 488:

а – к 3 неделе после имплантации площадь скоплений и число самих

светящихся клеток в них значительно уменьшились;

б – на 4 неделе в единичных скоплениях только по периферии содержится небольшое число крупных клеток с различными по размерам флюоресцирующими гранулами

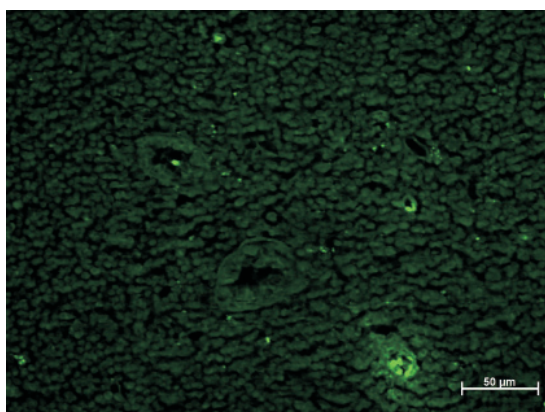


Рис. 3. Поднижнечелюстной лимфатический узел на 3 неделе после внедрения ПГА без АММСККП в участок повреждения нижнечелюстной кости в эксперименте. Неокрашенный срез в отраженном ультрафиолетовом свете с фильтром Alexa 488. Все флюоресцирующие клетки являются эритроцитами, расположенными во внутривузловых сосудах

На рис. 1, 2 четко видно, что ткань овальных скоплений светящихся клеток отличается по плотности и фоновой окраске от окружающих тканей и имеет четкую границу.

Кроме этого, на этих же рис. 1, 2 хорошо видна флюоресценция эритроцитов в сосудах, проходящих рядом со скоплением крупных светящихся клеток и внутри его. Эритроциты, согласно литературным данным, обладают аутофлюоресценцией [8].

В лимфатических узлах животных после применения ПГА без АММСККП светящиеся объекты отсутствовали как поодиночке, так и скоплениями. Иногда были видны единичные небольшие светящиеся объекты (клетки), но это были обладающие аутофлюоресценцией эритроциты во внутривузловых сосудах [8] (рис. 3).

В течение 5 недель после имплантации ПГА с адсорбированными АММСККП с трансфицированным геном GFP в дефект

кости нижней челюсти в субмандибулярных лимфатических узлах присутствовали овальные скопления ярко светящихся клеток. Эти клетки были очень крупными, до 20 мкм в диаметре.

Такие клетки с флюоресценцией располагались в лимфоидных узелках, в пользу чего свидетельствует то, что на некоторых препаратах четко видны различия в плотности тканей между скоплениями светящихся клеток и вокруг них, и то, что такие скопления имеют шаровидную форму и расположены только в корковом веществе недалеко от капсулы, то есть в корковом плато, а не в паракорткесе и не среди мозговых синусов в мякотных тяжах.

Скорее всего, светящиеся клетки в лимфатических узлах являются макрофагами. Такое заключение сделано на основании нескольких причин:

1. Размер клеток. Только очень немногие клетки могут превышать по размеру 20 мкм, и среди таких клеточных элементов – макрофаги.

2. Наличие множества разнокалиберных включений, которые, скорее всего, являются лизосомами.

3. Неправильная форма клеток.

4. Расположение в лимфатических узлах. В лимфатических узлах макрофагов очень много в герминативных центрах лимфоидных узелков, куда они представляют антигены для осуществления иммунных функций и где они фагоцитируют и лизируют клетки с признаками деструктивных изменений, множество которых образуется при делении и дифференцировке В-лимфоцитов.

В таком случае светящиеся разнокалиберные гранулы в макрофагах являются лизосомами с поглощенным флюоресцентным материалом.

Можно сделать предположение, что такие крупные светящиеся клетки в лимфатических узлах являются не просто макрофагами, а макрофагами, которые фагоцитировали введенные АММСККП или структуры, сформированные из таких клеток. В научной литературе имеются данные, указывающие на возможность флюоресценции макрофагов за счет свечения фагоцитированного и метаболизированного материала в их гранулах [7].

Вместе с лимфой в лимфатические узлы поступает и часть введенных АММСККП, тем более, что не все они жизнеспособны. В узлах макрофаги поглощают антигенный материал и, видимо, попавшие туда АММСККП вместе со светящимся белком GFP и их фрагменты. В таких случаях лизосомы макрофагов, в которых находится флю-

оресцентный белок, могут светиться в отраженном свете так же, как и сами АММСККП с трансфицированным геном GFP.

Таким образом, не исключено создание иммунной защиты против введенных АММСККП 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 не будет формироваться никаких структур.

Постепенно введенные АММСККП замещаются собственными клетками и структурами. Вследствие того, что структур, построенных из имплантированных АММСККП, становится все меньше, в лимфатических узлах сокращается количество светящихся макрофагов, содержание светящихся гранул в них и интенсивность свечения.

Заключение

После внедрения в участок повреждения кости нижней челюсти ПГА с адсорбированными АММСККП 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 недель после операции, а далее начинает уменьшаться. Видимо, введенные таким способом АММСККП частично поглощаются макрофагами. При разрушении структур, сформированных из АММСККП, 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.

Список литературы

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., Колесников И.С., Шевела А.И. и др. Влияние фибринового сгустка при повреждении кости нижней челюсти в эксперименте // *Стоматология*. – 2011. – Т. 90. – № 4. – С. 9–12.
3. Майбородин И.В., Матвеева В.А., Колесников И.С. и др. Регенерация поврежденной кости нижней челюсти крыс после использования аутологических стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения, адсорбированных на фибриновом сгустке // *Морфология*. – 2011. – Т. 140. – № 6. – С. 79–85.
4. Майбородин И.В., Шевела А.И., Морозов В.В. и др. Особенности ангиогенеза после имплантации пленок из полигидроксиалканоеата с адсорбированными мультипотент-

ными стромальными стволовыми клетками костномозгового происхождения // Морфология. – 2013. – Т. 143. – № 1. – С. 41–47.

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. 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.

7. 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.

8. Watson J. Suppressing autofluorescence of erythrocytes // Biotech. Histochem. – 2011. – Vol. 86. – № 3. – P. 207.

References

1. Volozhin A.I., Vasil'ev A.Ju., Mal'ginov N.N. i dr. Ispol'zovanie mezenhimal'nyh stvolovyh kletok dlja aktivizacii reparativnyh processov kostnoj tkani cheljusti v jeksperimente // Stomatologija. 2010. T. 89. no. 1. pp. 10–14.

2. Majborodin I.V., Kolesnikov I.S., Shevela A.I. i dr. Vlijanie fibrinovogo sgustka pri povrezhdenii kosti nizhnej cheljusti v jeksperimente // Stomatologija. 2011. T. 90. no. 4. pp. 9–12.

3. Majborodin I.V., Matveeva V.A., Kolesnikov I.S. i dr. Regeneracija povrezhdennoj kosti nizhnej cheljusti krysa posle ispol'zovanija autologichnyh stromal'nyh stvolovyh kletok kostnomozgovogo proishozhdenija, adsorbirovannyh na fibrinovom sgustke // Morfologija. 2011. T. 140. no. 6. pp. 79–85.

4. Majborodin I.V., Shevela A.I., Morozov V.V. i dr. Osobnosti angiogeneza posle im-plantacii plenok iz poligidroksi-

alkanoata s adsorbirovannyimi mul'tipotentnymi stromal'nyimi stvolovyimi kletkami kostnomozgovogo proishozhdenija // Morfologija. 2013. T. 143. no. 1. pp. 41–47.

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. no. 2. pp. 249–257.

6. 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. no. 21. pp. 2274–2291.

7. 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. pp. 103–113.

8. Watson J. Suppressing autofluorescence of erythrocytes // Biotech. Histochem. 2011. Vol. 86. no. 3. pp. 207.

Рецензенты:

Склянов Ю.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии педиатрического факультета, ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Росздрава, г. Новосибирск;

Талалаев С.В., д.м.н., заведующий кафедрой гистологии, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 10.06.2014.