

Долговременные эффекты стволовых клеток на облученных мышей

М.В. Вялкина, И.Б. Алчинова, Е.Н. Яковенко, Ю.С. Медведева,
И.Н. Сабурин, М.Ю. Карганов

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

Контактная информация: д.б.н. Карганов Михаил Юрьевич, mkarganov@mail.ru

Мышей линии С57В1/6У облучили гамма-излучением в сублетальной дозе 7,5 Гр. Через 3 ч им были внутривенно введены мультипотентные мезенхимные стромальные клетки из костного мозга в дозе 10^6 клеток на мышь. Используемые методы: определение массы тела, тест поведения в «открытом поле», исследование субфракционного состава сыворотки крови (лазерная корреляционная спектроскопия), гистологическое исследование селезенки, печени и поджелудочной железы, подсчет Т- и В-клеток (цитометрия), лейкоцитарная формула крови. Через 1,5 и 3 мес. было выявлено промежуточное положение изучаемых параметров животных, получивших клетки, между показателями интактного и облученного контролей, что позволяет судить о частичном терапевтическом эффекте введенных клеток.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, костный мозг, гамма-излучение, лазерная корреляционная спектроскопия, регенеративная медицина.

Введение

Разработка новых способов терапии острых и отдаленных последствий облучения обусловлена все возрастающей террористической угрозой и возможностью техногенных катастроф на ядерных объектах. Острые эффекты высоких доз радиации, приводящие к лучевой болезни, изучены достаточно хорошо. Наиболее ярко они проявляются в клетках костного мозга, желудочно-кишечном тракте, сердечно-сосудистой и центральной нервной системах [19].

Облучение в сублетальных дозах с течением времени приводит к развитию симптомокомплекса, сходного с синдромом полиорганной недостаточности, а затем и к отказу отдельных органов [23]. Хотя эти эффекты считаются дозозависимыми, прогноз отказа того или иного органа затруднен в связи с различной

радиочувствительностью даже клеток одной ткани [23], не говоря уже об индивидуальной радиочувствительности.

В связи с этим появляется необходимость разработки эффективной терапии, способной воздействовать не только на критически поврежденный орган, но и на весь организм. Кроме того, обязательным условием должна быть возможность применения данной терапии в течение короткого времени после повреждающего воздействия, чтобы предотвратить смерть и защитить облученные клетки.

В настоящее время как прогрессивную методику такого подхода интенсивно изучают трансплантацию мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) из разных источников, таких как костный мозг, пуповинная кровь, жировая ткань и др. [14, 16, 20].

Материалы и методы

Подготовка ММСК из костного мозга

Для получения первичной культуры ММСК костного мозга человека мононуклеарную фракцию клеток изолировали из костного мозга подвздошного гребня здоровых доноров градиентным центрифугированием с фиколлом. Полученные клеточные суспензии центрифугировали в течение 7 мин при 1000 об/мин, супернатанты сливали, осадки ресуспендировали в ростовой среде (α -МЕМ, 17% FCS, L-глутамин (2мМ), 1% пенициллин-стрептомицин). Клетки высевали в высокой плотности (1×10^5 клеток/см²) в чашки Петри. Через 24 ч не прикрепившиеся клетки удаляли вместе с ростовой средой, прикрепившуюся культуру отмывали р-ром Хенкса, добавляли свежую питательную среду и продолжали инкубировать в течение 4-8 сут. При достижении первичными культурами 70% конfluenceности клетки отмывали р-ром Версена, снимали с пластика, инкубируя в течение 3-5 мин при 37°C в 0,25% р-ре трипсина, центрифугировали (10 мин при 1000 об/мин), ресуспендировали в ростовой среде для инактивации трипсина, вновь центрифугировали и высевали в чашки Петри в полной питательной среде (DMEM/F12 1:1), L-глутамин (2 мМ), 1% пенициллин-стрептомицин, FGF (10 нг/мл), ИТС (1:100, 10% FCS) с плотностью 100 клеток/см².

В ходе культивирования культура ММСК становилась менее гетерогенной и уже после 2-го пассажа была представлена в основном (более 90%) мелкими клетками (6-9 мкм).

ММСК экспрессировали маркеры к CD73 (95%), CD90 (79%), CD105 (98%) и не экспрессировали к CD14 (1,1%),

CD34 (1,31%), CD45 (0,6%), CD49b (1%). Высокий уровень экспрессии маркерных белков является важным критерием чистоты и качества культуры ММСК с преобладанием клеток-предшественников с высокой клоногенной активностью, пролиферативным и дифференцировочным потенциалом. Данные клеточные культуры ММСК применялись во всех дальнейших экспериментах.

Животные и экспериментальные группы

Работа была выполнена на самцах мышей линии C57Bl/6Y (получены из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) средней массой 25-27 г.

Животные содержались в виварии, по 5-10 особей в пластиковых клетках на подстилке из мелкой древесной стружки, со свободным доступом к корму и воде.

Мышей облучали гамма-излучением до сублетальной дозы 7,5 Гр при интенсивности 5,4 Р/мин на цезиевом облучателе «Панорама» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, Москва).

Были сформированы следующие группы: интактный контроль (n=11); облученная группа (n=19) – животные, подвергнутые действию гамма-излучения; опытная группа (n=41) – животные, подвергнутые действию гамма-излучения и получившие через 3 ч внутривенную инъекцию изучаемых клеток в дозе 10^6 клеток/мышь; «зеленый белок» (n=6) – опытные животные, получившие инъекцию клеток, содержащих ген зеленого белка (green fluorescent protein).

На 1-й, 3-й, 6-й неделях и через 3 мес. оценивали физиологические параметры

и ответные реакции организма на облучение.

Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

Взвешивание животных

Измерение массы тела животных проводили на весах марки Mettler Toledo, за 1 час до взвешивания животных лишали корма. Вычисляли прирост массы каждого животного в процентах по сравнению с исходным измерением.

Поведенческий тест «Открытое поле»

Для изучения параметров двигательной активности грызунов после действия сильного стрессогенного фактора использовали установку «Открытое поле» Opto-Varimex («Columbus instruments», США). В тесте оценивали вертикальную и горизонтальную двигательную активность. Длительность теста составляла 3 мин. Тестирование проводилось в квадратной камере размером 45x45 см при освещении в 40 Лк.

Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС)

Субфракционный состав сыворотки крови оценивали методом лазерной корреляционной спектроскопии. Этот метод основан на анализе спектров квазиупругого светорассеяния когерентного монохроматического излучения лазера на частицах биологических жидкостей [3]. Гистограммы распределения вклада в светорассеяние дают информацию о средних размерах частиц и их относительном содержании. Прямое соответствие определенных фрагментов спектра биологической природе компонентов

сыворотки может быть выявлено в дополнительных исследованиях.

Гистологическое исследование селезенки, печени и поджелудочной железы

В конце эксперимента все животные были подвергнуты эвтаназии путем передозировки анестезирующего препарата с дальнейшим взятием органов (печень, поджелудочная железа, селезенка) для проведения гистологического исследования с целью оценки повреждающего действия облучения. Органы фиксировали в 4% р-ре нейтрального формалина. Препараты готовили согласно принятой методике [6].

Для упрощения обработки материала в зависимости от степени изменения морфологии клеток и тканей были выделены несколько степеней тяжести повреждений [8]. Изменения органов, описываемые второй, третьей, четвертой и пятой степенями, характерны для лимфоидного или миелоидного лейкоза разной степени тяжести (нулевая степень – норма, первая – незначительные изменения тканей селезенки и печени). В описании гистологии поджелудочной железы первая степень характеризовала атрофию паренхимы органа.

Исследование изменений в картине крови

Забор крови у мышей проводили из малой подкожной вены голени [7]. После этого 100 мкл цельной крови помещали в пластиковые пробирки со 100 мкл физ. р-ра. Образцы выдерживали 0,5-2 ч при комнатной температуре и центрифугировали при 5000 об/мин 15 мин. Супернатант отбирали в пластиковые пробирки.

Определение изменения количественных показателей клеток крови происходило путем подсчета лейкоцитарной

формулы. Использовали комбинированную окраску по Паппенгейму. Цитометрию на лазерном проточном цитофлуориметре EPIC XL 4colors («Becton Coulter», США) выполняли по методике производителя прибора с использованием антител с тройной меткой.

Оценка миграции ММСК

Для оценки миграции вводимых клеток выделяли костный мозг из бедренных костей и печень мышей, которым были введены клетки, меченые «зеленым белком». Гистологический материал был заморожен на -80°C . Для получения срезов использовали замораживающий микротом Micron HM 550 («Thermo Scientific», США). Срезы исследовали на флуоресцентном микроскопе.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов осуществляли с использовани-

ем стандартного пакета программы Statistica 8. Применяли U-критерий Манна-Уитни (сопоставление двух групп по одному или нескольким количественным признакам, имеющим хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального), H-критерий Краскала – Уоллиса (сопоставление трех и более групп по одному или нескольким количественным признакам, имеющим хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального).

Результаты исследований

Изменения на организменном уровне Одним из очевидных критериев, позволяющих оценить радиорезистентность организма, является выживаемость. Достоверных различий в количестве погибших от облучения животных между группами выявлено не было.

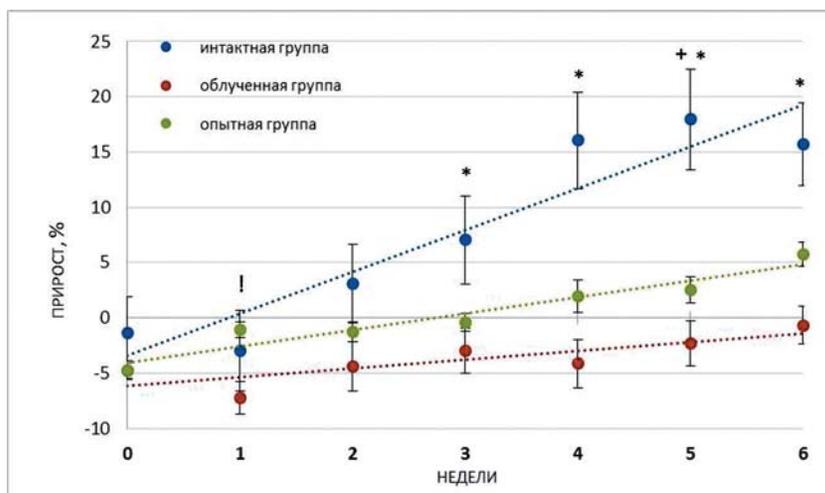


Рис. 1. Динамика массы тела животных. Пунктир – линии тренда (линейная зависимость).

Примечания:

* – отличия показателей интактного и облученного контролей достоверны, $P_H < 0,05$;

+ – отличия показателей интактного контроля и опытной группы достоверны, $P_H < 0,05$;

! – отличия показателей облученного контроля и опытной группы достоверны, $P_H < 0,05$.

Анализ массы тела и двигательной активности также не выявили значительных различий. В течение эксперимента динамика изменений массы тела и уровень горизонтальной и вертикальной двигательной активности животных опытной группы имели промежуточное значение между сопоставимыми показателями интактной и облученной группы (рис. 1, 2).

Особенности клеточных реакций

При подсчете формулы крови через 3 недели у облученных животных наблюдали возрастание количества нейтрофилов (палочкоядерных и сегментоядерных) и истощение запаса лимфоцитов (рис. 3).

Причем, количество Т-лимфоцитов у животных опытной группы имело средние значения между сопоставимыми

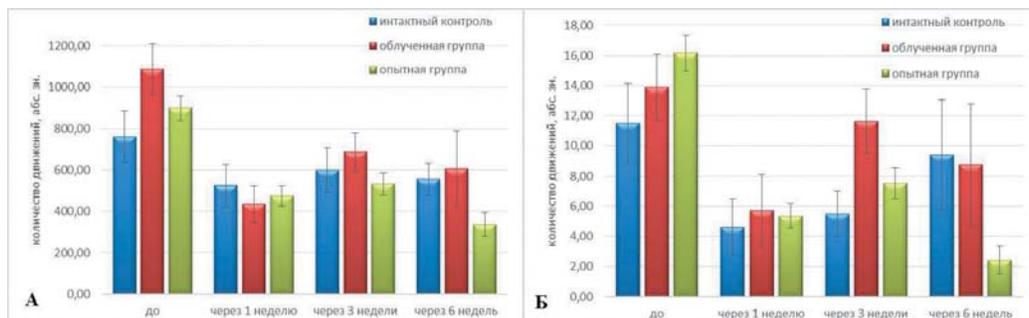


Рис. 2. Изменение горизонтальной (А) и вертикальной (Б) двигательной активности животных.

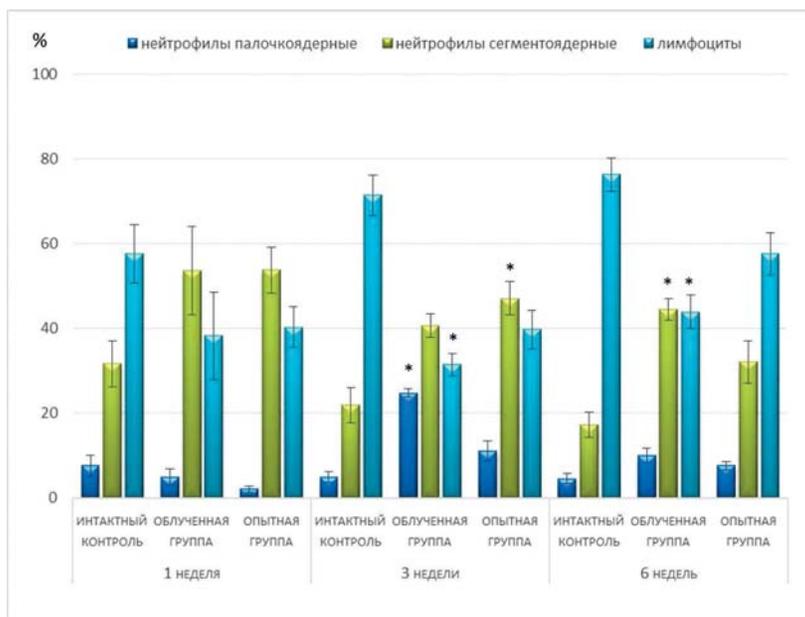


Рис. 3. Содержание лимфоцитов и нейтрофилов в крови мышей трех групп.
Примечание: * – сравнение с соответствующим временным контролем, $P_H < 0,05$.

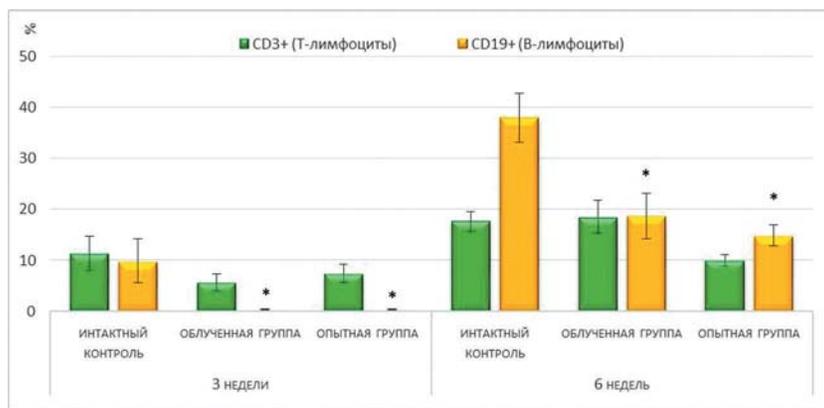


Рис. 4. Содержание Т- и В-лимфоцитов в крови мышей экспериментальных групп на 3-й и 6-й неделях эксперимента.
Примечание: * – $P_H < 0,05$ – сравнение с соответствующим временным контролем.

ми показателями контрольной группы и группы облученных мышей, а по В-лимфоцитам различий между опытной и облученной группами не наблюдалось (рис. 4).

По истечении шести недель количество нейтрофилов и лимфоцитов, рассчитанное по формуле крови, в опытной группе – среднее между сопоставимым показателем в интактном контроле и

группе облученных мышей (рис. 3). Количество лейкоцитов, а также Т- и В-лимфоцитов в опытной группе ниже, чем в двух других, несмотря на то, что к шестой неделе у всех облученных животных наблюдали выход новых лимфоцитов в кровь (рис. 4).

Через 3 мес. содержание лимфоцитов возвращается к нормальным значениям (рис. 5).

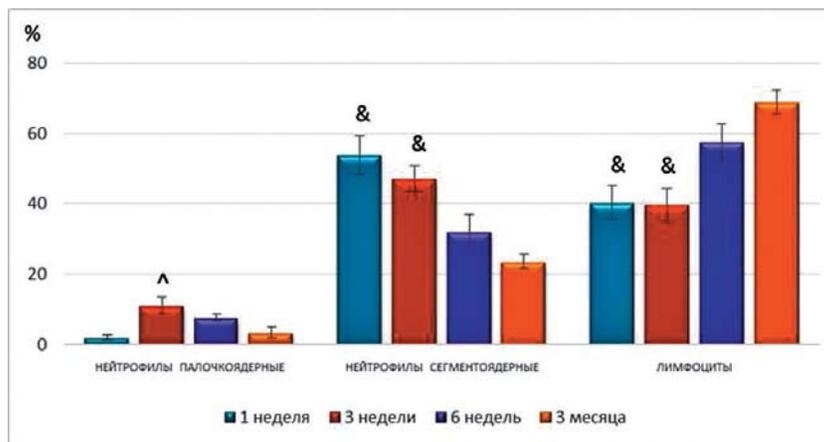


Рис. 5. Изменение содержания лимфоцитов и нейтрофилов в крови мышей опытной группы в течение эксперимента.
Примечания: & – $P_H < 0,05$ – сравнение с показателями, полученными в 3 мес.;
^ – $P_H < 0,05$ – сравнение с показателями, полученными в 1 неделю.

Метаболические сдвиги в организме облученных животных

Для оценки изменений в сывороточном гомеостазе крови после облучения использовали метод лазерной корреляционной спектроскопии.

Через 3 недели после облучения в опытной группе наблюдалась тенденция к нарастанию мелких частиц в субфракционном составе сыворотки крови, а через 6 недель было замечено увеличение вклада в светорассеяние крупных частиц (рис. 6).

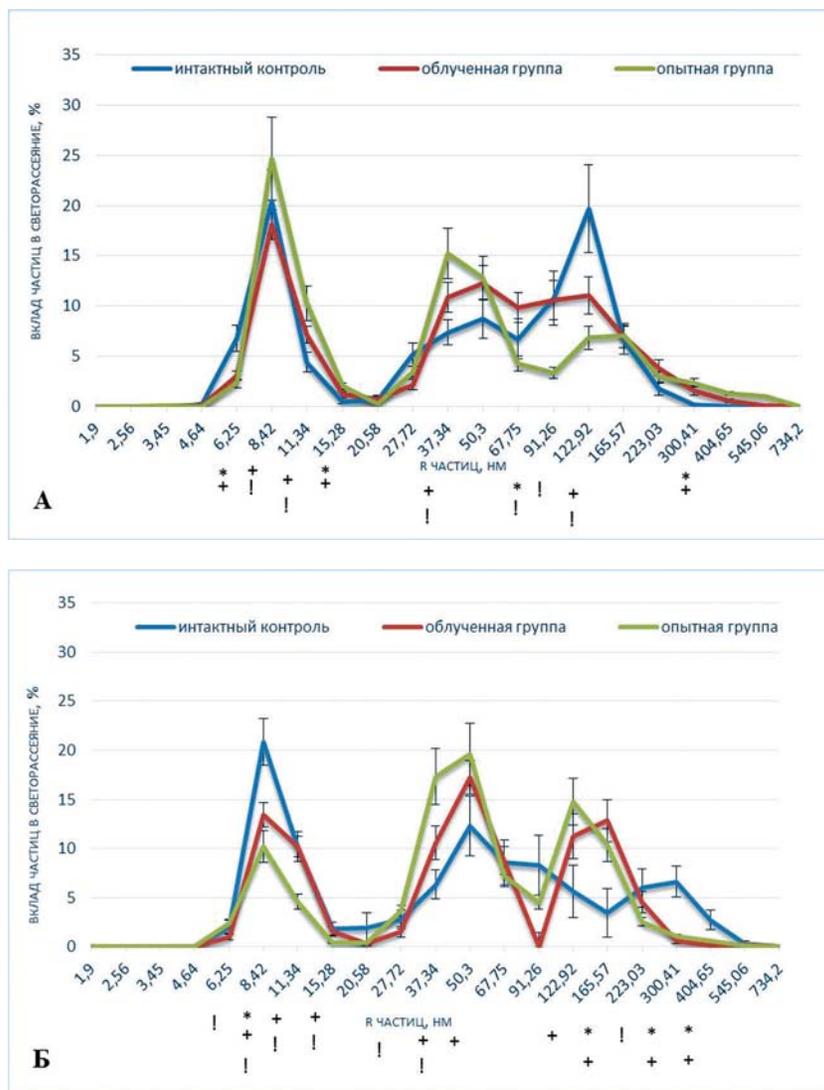


Рис. 6. Изменения в ЛК-спектрах сыворотки крови мышей экспериментальных групп на 3-й (А) и 6-й (Б) неделях.

Примечания:

* – отличия показателей интактного контроля и облученной группы достоверны, $P_U < 0,05$;

+ – отличия показателей интактного контроля и опытной группы достоверны, $P_U < 0,05$;

! – отличия показателей облученной и опытной группы достоверны, $P_U < 0,05$.

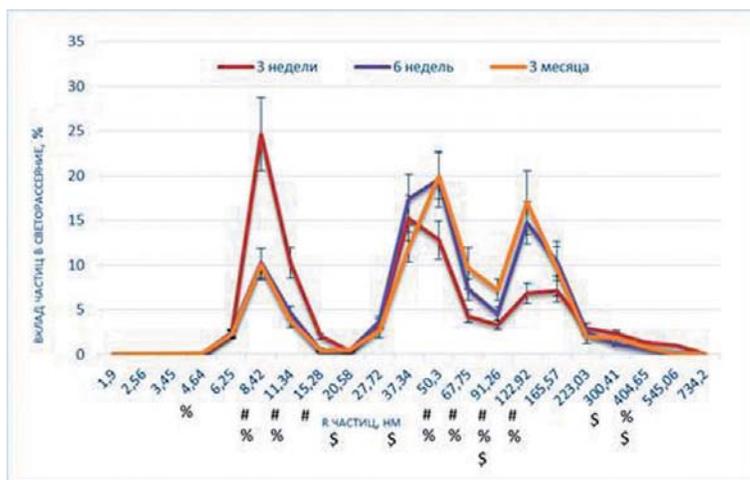


Рис. 7. Изменения в ЛК-спектрах сыворотки крови опытной группы мышей в течение эксперимента.

Примечания:

– отличия показателей 3-й недели и 6-й недели достоверны, $P_U < 0,05$;

% – отличия показателей 3-й недели и 3-го мес. достоверны, $P_U < 0,05$;

\$ – отличия показателей 6-й недели и 3-го мес. достоверны, $P_U < 0,05$.

По истечении трех мес. эксперимента распределение субклеточных частиц в сыворотке крови существенно не изменилось (рис. 7).

Гистологическое исследование

По истечении трех недель гистологические исследования показали, что в опытной группе частота встречаемости тяжелых степеней повреждения селезенки, печени и поджелудочной железы существенно ниже, чем в облученной группе (рис. 8).

Через 6 недель в опытной группе существенно ухудшилась гистологическая картина селезенки, преобладает 4-я степень повреждения (рис. 8А).

Через 3 мес. частота встречаемости тяжелого повреждения селезенки снижается (рис. 9А), а поджелудочной железы – увеличивается, притом, что морфологическая картина этого органа в опытной группе лучше, чем в облученном контроле (рис. 9Б).

Оценка миграции ММСК

Шести мышам были инъецированы исследуемые клетки, помеченные «зеленым белком», для оценки миграции ММСК. Через 3 недели в тканях печени меченые клетки обнаружены не были. Через 6 недель на криосрезах костного мозга мышей были выявлены флуоресцирующие круглые клетки, а через 3 мес. меченые клетки присутствовали и в тканях печени, и в тканях костного мозга бедренных костей, т.е. в местах наибольшего повреждения клеток в организме.

Обсуждение результатов

Целью данной работы было исследовать и оценить возможность и эффективность применения ММСК костного мозга в качестве терапии последствий действия ионизирующего излучения на лабораторных животных. Предварительные результаты данного исследования были опубликованы ранее [22].

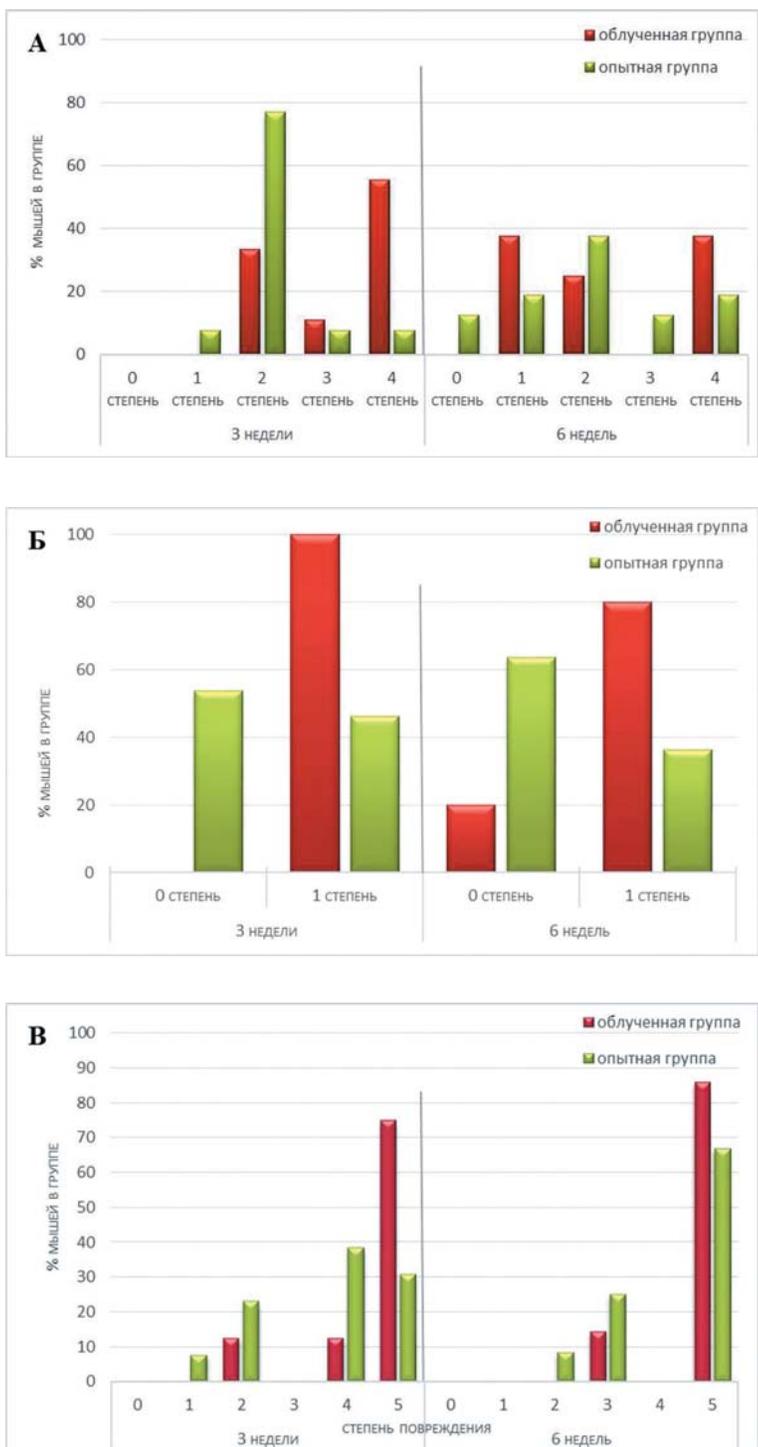


Рис. 8. Распределение степеней повреждения селезенки (А), поджелудочной железы (Б) и печени (В) в облученной и опытной группах через 3 и 6 недель после облучения.

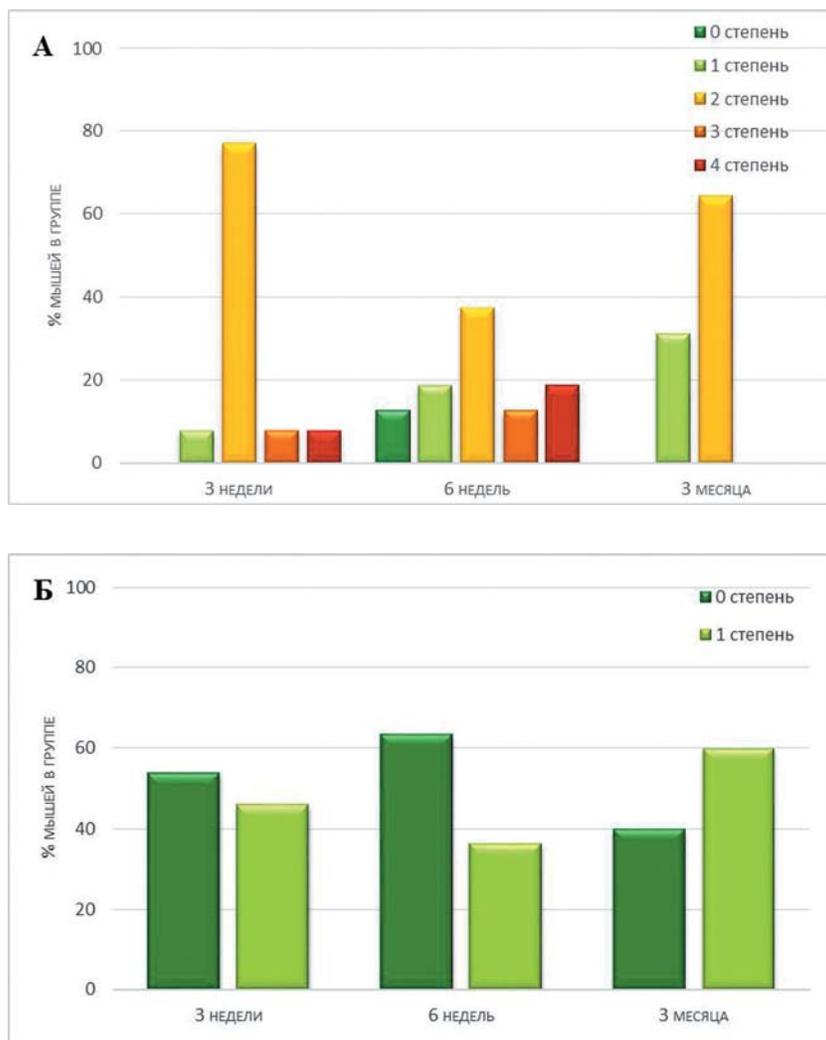


Рис. 9. Динамика проявлений различных степеней повреждения селезенки (А) и поджелудочной железы (Б) в опытной группе в течение эксперимента.

Экспериментальные данные, полученные на животных, показывают, что введение стволовых клеток костного мозга достаточно эффективно в терапии последствий острого ионизирующего облучения. Даже однократная внутривенная инфузия может улучшить показатели выживаемости после получения летальной дозы облучения в сравнении с контрольной группой [24]. У животных значительно

уменьшается потеря массы тела, наблюдается снижение потребления воды, ускорение заживления ран [15]. На клеточном уровне наблюдается подавление апоптоза, повышение интенсивности клеточного цикла, ускорение процессов митоза [14]. ММСК отвечают за поддержку и мониторинг кроветворения, регенерацию различных тканей взрослого организма и за модуляцию иммунного ответа [21].

Действие высоких доз радиации вызывает повреждение кишечника и печени в первые недели после облучения, что влияет на усвоение пищи и приводит к изменению массы животных. Из литературы известно, что острое облучение в высоких дозах приводит к стойкому снижению массы тела. Однако в наших предшествующих экспериментах обнаружены межлинейные различия в изменении массы тела после облучения, что, возможно, связано с развитием метаболического синдрома [18]. В течение эксперимента темп прироста массы животных опытной группы имел промежуточное значение между показателями контрольной и облученной группы (рис. 1). Такую же ситуацию наблюдали и при исследовании двигательной активности животных (рис. 2). Уровень прироста массы тела, средний по группе, может служить комплексным показателем скорости обменных процессов при работе с лабораторными животными, но, к сожалению, не позволяет адекватно определить механизмы происходящих сдвигов. Для решения этой задачи необходимо проводить дополнительные исследования для оценки изменений на разных структурно-функциональных уровнях организма.

Изменения в картине крови являются основными признаками при воздействии гамма-излучения в значительных дозах. Когда кроветворная система подвергается действию ионизирующего излучения, в первую очередь нарушается ее гомеостаз. Лимфоидная ткань обедняется клеточными элементами раньше, чем ткань костного мозга. Причем, лимфопения – снижение общего числа лимфоцитов – развивается сразу после острого воздействия даже низких доз

излучения, в то время как зрелые гранулоциты, эритроциты и тромбоциты могут переносить более высокие дозы [21].

По данным литературы, формула крови мышей в норме имеет следующий вид: лимфоциты 63-75%, моноциты 0,7-2,6%, нейтрофилы 6,7-37,2%, эозинофилы 0,9-3,8% [2]. Как показано на рис. 3, в интактной группе формула крови соответствовала норме, а в опытной группе отмечали преобладание сегментоядерных нейтрофилов, характерное, например, для гнойных абсцессов. Истощение запаса зрелых Т- и В-лимфоцитов у облученных животных через 3 недели (рис. 3) являлось следствием того, что предшественники этих клеток в костном мозге были разрушены действием радиации. По данным литературы, одним из свойств мезенхимных стволовых клеток является способность задерживать созревание Т-лимфоцитов [9, 17]. Этим фактом может быть объяснено более низкое количество лейкоцитов, а также Т- и В-лимфоцитов в опытной группе по сравнению с интактной и облученной группами на шестой неделе (рис. 4).

Истощение пула гемопоэтических стволовых клеток, вызванное действием облучения, увеличивает нагрузку на дифференцированные клетки, усиливаются процессы репарации и апоптоза [5]. Изменения в обменных процессах клеток и тканей вносят изменения в сывороточный гомеостаз. Биохимические сдвиги в крови облученных животных отчетливо выражены лишь в разгар лучевого поражения, оставаясь на начальных этапах поражения малозаметными. Однако метод ЛКС позволяет увидеть изменения даже на ранних стадиях повреждающего процесса.

После получения результатов ЛКС предположили, что увеличение вклада в светорассеяние мелких частиц на третьей неделе связано с деструкцией ткани (рис. 6А). Сам процесс облучения занимал 2,5 ч, за это время в организме животных усилились процессы образования активных форм кислорода и, как следствие, процессы деструкции ткани, которые реализовались в увеличении вклада мелких частиц. Доза облучения, полученная животными, была достаточна для развития у них лучевой болезни. Разрушение клеток и синтез антител послужили причиной увеличения процентного вклада в светорассеяние частиц размером свыше 165 нм. Разная чувствительность мышей к фактору воздействия проявилась в различной степени увеличения вклада крупных частиц. В группах облученных мышей происходят сходные процессы, однако введение клеток, видимо, стирает индивидуальные различия.

При облучении ткани печени, селезенки и поджелудочной железы подвергаются серьезному разрушению. Введение клеток улучшает состояние селезенки, печени, поджелудочной железы по сравнению с облученной группой (рис. 8). Процессы деструкции менее выражены.

Однако, если рассматривать динамику повреждений тканей поджелудочной железы, частота встречаемости 2-й степени повреждения становится выше через 3 мес. (рис. 9Б) при том, что морфологическая картина этого органа в опытной группе лучше, чем в облученном контроле. Ухудшение гистологических показателей селезенки к шестой неделе (рис. 9А) может быть обуслов-

лено реакцией на выход лимфоцитов, продукция которых была подавлена облучением.

По данным многочисленных исследований, стволовые клетки, вводимые в кровотоки, способны мигрировать и локализоваться в зоне повреждения без участия экзогенных индуцирующих «направляющих» факторов [11]. Такой феномен получил название «хуминг-эффект». Он нашел подтверждение в исследованиях *in vivo*, где было выявлено, что введенные внутривенно ММСК, хоть и локализовались большей частью в легких, в дальнейшем обнаруживались в жировой и хрящевой тканях, сердечной [13] и скелетной мышце, ткани печени, костном мозге, эндотелии, селезенке и тимусе животных [1]. Однако существует ряд работ, в которых ставится под сомнение способность ММСК достигать критических органов при внутривенном введении. При этом авторы не отрицают наличия терапевтического эффекта от такого воздействия. Так, в работе К. Ланге показано, что большая часть внутривенно вводимых клеток депонировалась в тканях легкого, и при выраженном улучшении состояния целевых органов исследования (костного мозга, периферической крови) вводимых клеток в них обнаружено не было [4]. В нашей работе вводимая нескольким опытным животным суспензия клеток была снабжена меткой «зеленого белка» именно для оценки миграционной способности ММСК. Обнаружение меченых клеток в костном мозге и печени доказывало, что введенные ММСК достигли критических органов, и наблюдаемые эффекты обусловлены – по крайней мере, отчасти – их воздействием.

Выводы

1. Обнаружение меченых клеток в костном мозге и печени позволяет утверждать, что наблюдаемые эффекты обусловлены экспериментальным воздействием.

2. Общая тенденция, заключающаяся в промежуточном положении параметров опытной группы, свидетельствует о частичном терапевтическом эффекте введенных клеток.

3. Отсутствие погибших животных на заключительной стадии эксперимента (от шести недель до трех мес.), нормализация и стабилизация их физиологических параметров позволяет судить о длительном характере наблюдаемых эффектов.

4. Полученные результаты согласуются с данными других авторов о перспективах использования стволовых клеток после облучения в высоких дозах [9, 15, 23].

Список литературы

1. **Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Чекнева И.С.** Клеточная терапия в лечении хронической сердечной недостаточности: виды применяемых стволовых клеток, результаты последних клинических исследований // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 15. – № 5. – С. 4-18.
2. **Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф.** Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука. – 1983. – 189 с.
3. **Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Яковенко Е.Н., Ковалева О.И., Медведева Ю.С., Вялкина М.В.** Применение метода лазерной корреляционной спектроскопии в лабораторной медицине // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61(9). – С. 533-534. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-9.

4. **Ланге К.** Мезенхимальные стромальные клетки защищают от острой лучевой болезни: понимание возможных механизмов // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2015. – № 1. – С. 58-70.
5. **Медведева Ю.С., Архипова Е.Н., Алчинова И.Б., Озерова М.А., Бобе А.С., Сдобноев Ц.Ц., Антипов А.А., Карганов М.Ю.** Особенности организменного ответа мышей разных линий на острое гамма-облучение // Биомедицина. – 2013. – № 2. – С. 67-79.
6. **Меркулов Г.А.** Курс патологистологической техники. – Л.: Медицина. – 1969. – 424 с.
7. **Степанова О.И.** Метод взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей // Биомедицина. – 2006. – № 2. – С. 137-139.
8. **Alchinova I., Arkhipova E., Medvedeva Yu., Cherepov A., Antipov A., Lysenko N., Noskin L., Karganov M.** The complex of tests for the quantitative evaluation of the effects of radiation on laboratory animals // Am. J. of Life Sciences. – 2015. – Т. 3. – No. 1-2. – Pp. 5-12. doi:10.11648/j.ajls.s.20150303.12.
9. **Andrade A.V.G., Riewaldt J., Wehner R., Schmitz M., Odendahl M., Bornhäuser M., Tonn T.** Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells // J. of cellular and molecular medicine. – 2014. – Т. 18. – No. 6. – Pp. 1184-1193.
10. **Chang P., Qu Y., Liu Y., Cui S., Zhu D., Wang H., Jin X.** Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury // Cell death & disease. – 2013. – Т. 4. – No. 6. – P. e685. doi:10.1038/cddis.2013.178.
11. **Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M., Fouillard L., Young R.G., Frick J., ... & Dudoignon N.** Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome // The journal of gene medicine. – 2003. – Т. 5. – No. 12. – Pp. 1028-1038.

12. **Gaberman E., Pinzur L., Levdansky L., Tsirlin M., Netzer N., Aberman Z., Gorodetsky R.** Mitigation of lethal radiation syndrome in mice by intramuscular injection of 3D cultured adherent human placental stromal cells // *PloS one*. – 2013. – T. 8. – No. 6. – P. e66549.
13. **Gao S., Zhao Z., Wu R., Zeng Y., Zhang Z., Miao J., Yuan Z.** Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model // *Radiation and Environmental Biophysics*. – 2016. – Pp. 1-15.
14. **Hu K.X., Sun Q.Y., Guo M., Ai H.S.** The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury // *The British journal of radiology*. – 2014.
15. **Kiang J.G., Gorbunov N.V.** Bone marrow mesenchymal stem cells increase survival after ionizing irradiation combined with wound trauma: characterization and therapy // *J. of Cell Science & Therapy*. – 2014. – T. 5. – No. 6. – P. 1.
16. **Lange C., Brunswig-Spickenheier B., Cappallo-Obermann H., Eggert K., Gehling U.M., Rudolph C., ... & Zander A.R.** Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation // *PloS one*. – 2011. – T. 6. – No. 1. – P. e14486.
17. **Lim J.Y., Park M.J., Im K.I., Kim N., Jeon E.J., Kim E.J., ... & Cho S.G.** Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of TH1/TH2 and th17/ treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model // *Cell transplantation*. – 2014. – T. 23. – No. 6. – Pp. 703-714.
18. **Medvedeva Yu., Arkhipova E., Alchinova I.** The effects of gamma-irradiation in sub-lethal doses in mice with different radiosensitivity // *Am. J. of Life Sciences*. – 2015. – T. 3. – No. 1-2. – Pp. 13-17. doi: 10.11648/j.ajls.s.20150303.13.
19. **Mortazavi S.M.J., Shekoohi-Shooli F., Aghamir S.M.R., Mehrabani D., Dehghanian A., Zare S., Mosleh-Shirazi M.A.** The healing effect of bone marrow-derived stem cells in acute radiation syndrome // *Pakistan J. of Medical Sciences*. – 2016. – T. 32. – No. 3. – P. 646.
20. **Shukai Q., Hanyun R., Yongjin S., Wei L.** Allogeneic compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation increases survival of mice exposed to lethal total body irradiation: a potential immunological mechanism // *Chin Med J. (En)*. – 2014. – T. 127. – Pp. 475-482.
21. **Sugrue T., Brown J.A., Lowndes N.F., Ceredig R.** Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines // *Stem cells*. – 2013. – T. 31. – No. 1. – Pp. 137-145.
22. **Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Y.S., Saburina I.N., Karganov M.Y.** Long-term effects of stem cells on total-body irradiated mice // *J. of Physics: Conference series*. – IOP Publishing. – 2017. – T. 784. – No. 1. – P. 012015.
23. **Williams J.P., McBride W.H.** After the bomb drops: a new look at radiation-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS) // *Int. J. of Radiation biology*. – 2011. – T. 87. – No. 8. – Pp. 851-868.
24. **Yang X., Balakrishnan I., Torok-Storb B., Pillai M.M.** Marrow stromal cell infusion rescues hematopoiesis in lethally irradiated mice despite rapid clearance after infusion // *Advances in hematology*. – 2012.

References

1. **Belenkov Ju.N., Privalova E.V., Chekneva I.S.** Kletochnaja terapija v lechenii hronicheskoj serdechnoj nedostatochnosti: vidy primenjaemyh stvolovyh kletok, rezul'taty poslednih klinicheskikh issledovanij [Cell therapy in the treatment of chronic heart failure: types of the applied stem cells, the results of recent clinical studies]. *Kardiologija i serdechno-sosudistaja hirurgija* [Cardiology and cardiovascular surgery]. 2008. T. 15. No. 5. Pp. 4-18. (In Russian).
2. **Blandova Z.K., Dushkin V.A., Malashenko A.M., Shmidt E.F.** Linii laboratornyh zhivotnyh dlja mediko-

- biologicheskikh issledovaniy [Lines of laboratory animals for medicobiological researches]. Moscow: Nauka. 1983. 189 p. (In Russian).
3. **Karganov M.Ju., Alchinova I.B., Jakovenko E.N., Kovaleva O.I., Medvedeva Ju.S., Vjalkina M.V.** Primenenie metoda lazernoj korreljacionnoj spektroskopii v laboratornoj medicine [Application of the method of laser correlative spectroscopy in laboratory medicine]. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika [Clinical laboratory diagnostics]. 2016. T. 61(9). Pp. 533-534. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-9. (In Russian).
 4. **Lange K.** Mezenhimal'nye stromal'nye kletki zashhishhajut ot ostroj luchevoj bolezni: ponimanie vozmozhnyh mehanizmov [Mesenchymal stromal cells protect against acute radiation sickness: understanding of possible mechanisms]. Medikobiologicheskije i social'no-psihologicheskije problemy bezopasnosti v chrezvychajnyh situacijah [Medicobiological and social and psychological security problems in emergency situations]. 2015. No. 1. Pp. 58-70. (In Russian).
 5. **Medvedeva Ju.S., Arhipova E.N., Alchinova I.B., Ozerova M.A., Bobe A.S., Sodboev C.C., Antipov A.A., Karganov M Ju.** Osobennosti organizmennogo otveta myshej raznyh linij na ostroe gamma-obluchenie [Features of the organismal response of mice of different lines to acute gamma irradiation]. Biomedicine. 2013. No. 2. Pp. 67-79. (In Russian).
 6. **Merkulov G.A.** Kurs patologistologicheskij tehniki [Course of pathological histology technique]. Leningrad: Medicina. 1969. 424 p. (In Russian).
 7. **Stepanova O.I.** Metod vzjatija krvi iz maloj podkozhnoj veny goleni u myshej [Method of taking blood from a small saphenous vein of the lower leg in mice]. Biomedicine. 2006. No. 2. Pp. 137-139. (In Russian).
 8. **Alchinova I., Arkhipova E., Medvedeva Yu., Cherepov A., Antipov A., Lysenko N., Noskin L., Karganov M.** The complex of tests for the quantitative evaluation of the effects of radiation on laboratory animals. Am. J. of Life Sciences. 2015. T. 3. No. 1-2. Pp. 5-12. doi:10.11648/j.ajls.s.20150303.12.
 9. **Andrade A.V.G., Riewaldt J., Wehner R., Schmitz M., Odendahl M., Bornhäuser M., Tonn T.** Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. J. of cellular and molecular medicine. 2014. T. 18. No. 6. Pp. 1184-1193.
 10. **Chang P., Qu Y., Liu Y., Cui S., Zhu D., Wang H., Jin X.** Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury. Cell death & disease. 2013. T. 4. No. 6. P. e685. doi:10.1038/cddis.2013.178.
 11. **Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M., Fouillard L., Young R.G., Frick J., ... & Dudoignon N.** Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. The journal of gene medicine. 2003. T. 5. No. 12. Pp. 1028-1038.
 12. **Gaberman E., Pinzur L., Levdansky L., Tsirlin M., Netzer N., Aberman Z., Gorodetsky R.** Mitigation of lethal radiation syndrome in mice by intramuscular injection of 3D cultured adherent human placental stromal cells. PloS one. 2013. T. 8. No. 6. P. e66549.
 13. **Gao S., Zhao Z., Wu R., Zeng Y., Zhang Z., Miao J., Yuan Z.** Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model. Radiation and Environmental Biophysics. 2016. Pp. 1-15.
 14. **Hu K.X., Sun Q.Y., Guo M., Ai H.S.** The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury. The British journal of radiology. 2014.
 15. **Kiang J.G., Gorbunov N.V.** Bone marrow mesenchymal stem cells increase survival after ionizing irradiation combined with wound trauma: characterization and therapy. J. of Cell Science & Therapy. 2014. T. 5. No. 6. P. 1.
 16. **Lange C., Brunswig-Spickenheier B., Cappallo-Obermann H., Eggert K., Ge-**

- hling U. M., Rudolph C., ... & Zander A.R.* Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. *PLoS one*. 2011. T. 6. No. 1. P. e14486.
17. *Lim J.Y., Park M.J., Im K.I., Kim N., Jeon E.J., Kim E.J., ... & Cho S.G.* Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of TH1/TH2 and th17/treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model. *Cell transplantation*. 2014. T. 23. No. 6. Pp. 703-714.
18. *Medvedeva Yu., Arkhipova E., Alchinova I.* The effects of gamma-irradiation in sub-lethal doses in mice with different radiosensitivity. *Am. J. of Life Sciences*. 2015. T. 3. No. 1-2. Pp. 13-17. doi: 10.11648/j.ajls.s.20150303.13.
19. *Mortazavi S.M.J., Shekoohi-Shooli F., Aghamir S.M.R., Mehrabani D., Dehghanian A., Zare S., Mosleh-Shirazi M.A.* The healing effect of bone marrow-derived stem cells in acute radiation syndrome. *Pakistan J. of Medical Sciences*. 2016. T. 32. No. 3. P. 646.
20. *Shukai Q., Hanyun R., Yongjin S., Wei L.* Allogeneic compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation increases survival of mice exposed to lethal total body irradiation: a potential immunological mechanism. *Chin Med J. (En)*. 2014. T. 127. Pp. 475-482.
21. *Sugrue T., Brown J.A., Lowndes N.F., Ceredig R.* Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines. *Stem cells*. 2013. T. 31. No. 1. Pp. 137-145.
22. *Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Y.S., Saburina I.N., Karganov M.Y.* Long-term effects of stem cells on total-body irradiated mice. *J. of Physics: Conference series*. IOP Publishing. 2017. T. 784. No. 1. P. 012015.
23. *Williams J.P., McBride W.H.* After the bomb drops: a new look at radiation-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Int. J. of Radiation biology*. 2011. T. 87. No. 8. Pp. 851-868.
24. *Yang X., Balakrishnan I., Torok-Storb B., Pillai M.M.* Marrow stromal cell infusion rescues hematopoiesis in lethally irradiated mice despite rapid clearance after infusion. *Advances in hematology*. 2012.

Long-term effects of stem cells on irradiated mice

**M.V. Vyalkina, I.B. Alchinova, E.N. Yakovenko, Yu.S. Medvedeva,
I.N. Saburina, M.Yu. Karganov**

C57Bl/6Y mice were exposed to gamma-radiation in a sublethal dose of 7.5 Gy. In 3 hours injection 10^6 mouse of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells intravenously to experimental group was done. Methods used: body weight measurement, «open field» behavior, subfraction composition of blood serum (laser correlation spectroscopy), histological examination of the spleen, liver, and pancreas, count of T- and B- cells (cytometry), white blood formula. After 1.5 and 3 months the general trend towards intermediate position of the parameters observed in the experimental between those in intact and irradiated controls attests to partial therapeutic effect of the injected cells.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, marrow, gamma-radiation, laser correlation spectroscopy, regenerative medicine.