

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МАССИРОВАННОЙ БЕЗРАДИАЦИОННОЙ ПЕРЕСАДКИ КОСТНОГО МОЗГА ОТ МОЛОДЫХ МЫШЕЙ СТАРЫМ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ

© М. В. Ковина,^{1,*} В. А. Зуев,² Г. О. Кагарлицкий,³ Ю. М. Ходарович³

¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, ² Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ

³ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

* электронный адрес: gershi2001@yahoo.com

Обновление ткани — известное явление, заключающееся в замещении стареющих и отмирающих клеток различных тканей организма потомством локальных или циркулирующих стволовых клеток (СК). Интересной и актуальной задачей является увеличение срока жизни стареющего организма за счет донорских СК, способных стимулировать обновление его тканей. В настоящей работе мы исследовали возможность применения СК костного мозга для увеличения продолжительности жизни. Для этой цели были созданы химерные мыши линии C57BL/6, полученные при трансплантации костного мозга (КМ) от молодых 1.5-месячных доноров к старым 21.5-месячным реципиентам. Трансплантацию проводили при помощи недавно разработанного метода массированной безрадиационной пересадки КМ, позволившего трансплантировать 1.5×10^8 клеток, что составляет около 25 % от общего количества собственных клеток КМ мыши. В более ранних работах при трансплантации КМ использовали значительно меньшее количество донорских клеток (5×10^6), что составляет около 1 % от общего количества клеток КМ мыши. Реципиент предварительно получал летальную (для контрольных животных) дозу рентгеновского облучения, что исключало возможность продления жизни этим методом. В результате применения модифицированного метода средняя продолжительность дожития (с 21.5 мес) контрольной группы составила 3.4 мес, а экспериментальной — 4.9 мес, что соответствует приросту 1.5 мес, или 44 %.

Ключевые слова: массированная трансплантация, костный мозг, стволовые клетки, продолжительность жизни, дожитие.

В настоящее время считается, что многие ткани взрослого организма способны к регенерации (самообновлению) за счет резидентных или циркулирующих стволовых клеток (СК). Самообновление тканей происходит непрерывно: так, в сердце крыс около 7 % клеток замещается ежемесячно (Kajstura et al., 1996), обновление же крови и эпителиальных тканей происходит значительно быстрее. Участие не только локальных, но и циркулирующих СК в обновлении тканей было продемонстрировано многочисленными работами по разнополой трансплантации, сопровождающейся значительным у/х-химеризмом (Körbling et al., 2002; Herzog et al., 2003; Thiele et al., 2004). Значение этих работ особенно возросло сейчас, когда с помощью экстракорпорального оплодотворения родительских гамет и отбора зигот (Grewal et al., 2004), а также с помощью репрограммирования соматических клеток (Takahashi, Yamanaka, 2006; Wang et al., 2011) появилась возможность создавать трансплантационный клеточный материал, генетически идентичный клеткам пациента.

Наши предыдущие работы *in vitro* показали, что недифференцированные СК действительно могут при определенных условиях эффективно дифференцироваться в тот клеточный тип, к которому принадлежит их клеточное микроокружение (Ковина, Ходарович, 2011). Это

объясняет не вполне понятную ранее эффективность пересадки костного мозга при исцелении не только болезней крови (анемия Фанкони; Gluckman et al., 1995), но и таких системных заболеваний, как мукополисахаридоз и старческая тугоухость (Birkenmeier et al., 1991; Iwai et al., 2001; Corti et al., 2004; Willenbring et al., 2004). Мукополисахаридоз вызывается недостаточностью ферментов, требуемых для деградации глюкозаминов, накапливающихся в лизосомах клеток многих органов, вызывая их дисфункцию и сокращение срока жизни. Трансплантация сингенных клеток костного мозга от здоровых мышей приводила к увеличению продолжительности жизни с 0.5 до контрольной — 2 года. При этом лизосомальная активность восстанавливалась полностью или частично во всех исследованных тканях: для тимуса, селезенки, костного мозга восстановление было полным, для легких составило 50 %, для почек и печени — 20, для мозга — 7 % (Birkenmeier et al., 1991). Этот результат логично объясняется замещением тканей потомством клеток костного мозга донора, однако авторы не определяли степень химеризма. В следующей работе этого типа было показано излечение наследственного заболевания кожи трансплантацией КМ; химеризм кожи был определен и составил от 10 до 30 %, а химеризм слизистого эпителия ЖКТ — 50 % (Wagner et al., 2010). Эти факты привели ученых к выводу о том, что костный

мозг кроме кроветворных и стромальных клеток содержит клетки, способные дифференцироваться в зрелые клетки многих других тканей (Herzog et al., 2003).

Тем не менее пока неясно, может ли такая регенерация замедлить нормальный процесс старения. Поскольку применявшиеся ранее методики пересадки КМ требовали жесткого рентгеновского облучения, негативно влияющего на продолжительность жизни контрольных животных (Birkenmeier et al., 1991), сообщения об успешных попытках применения этого метода для продления жизни при нормальном старении отсутствуют. В данной работе мы описываем влияние на продолжительность жизни массивированной безрадиационной трансплантации старым мышам КМ молодых доноров.

Материал и методика

Выделение костного мозга. В качестве доноров костного мозга использовали мышей линии C57BL/6 в возрасте 6 нед. Доноров КМ умерщвляли с помощью метода цервикальной дислокации и санаворовали 70%-ным этанолом. Выделение костного мозга проводили согласно методике (Colvin et al., 2004) с небольшими модификациями. Вначале вырезали позвоночник и череп, освобождали их от окружающих тканей, спинного и головного мозга с помощью стерильных скальпеля, ножниц и пинцета. Хвостовую часть позвоночника удаляли. Очищенные таким образом позвоночник и кости черепа измельчали с помощью стерильных пестика и ступки в 1–2 мл охлажденного стерильного HBSS-буфера следующего состава: 0.44 mM фосфат калия, 5.37 mM хлорид калия, 0.34 mM двухосновный фосфат натрия, 136.89 mM хлорид натрия и 5.55 mM D-глюкоза. Полученную смесь фильтровали через 4 слоя мелкочаечистой капроновой ткани и промывали в свежем буфере HBSS, после чего производили центрифугирование при мягких условиях (50 g). Осадок ресуспензировали в 1 мл HBSS, количество клеток подсчитывали при помощи камеры Горяева, после чего добавляли HBSS до финальной концентрации 5×10^7 клеток в 1 мл. Общее количество выделенных клеток различных размеров и морфологии составляло $3.5\text{--}4.5 \times 10^8$.

Трансплантация костного мозга. Трансплантацию КМ осуществляли мышам линии C57BL/6 в возрасте 21.5 мес. Предварительная подготовка супензии клеток включала в себя фильтрацию через 4 слоя мелкочаечистой капроновой ткани и добавление 5 ед. гепарина (Синтез, Россия) на дозу (2.5×10^7 клеток в 0.5 мл HBSS) для предотвращения закупорки сосудов клеточным материалом. Хвост мыши прогревали в воде с температурой 50–55 °C до четкого проявления парных хвостовых вен, после чего в одну из вен медленно (в течение 20 с) вводили дозу клеточной супензии с помощью инсулинового шприца.

Трансплантацию проводили 3 дня подряд по 2 раза в сутки с интервалом 8–16 ч, что доводило количество трансплантированных клеток до 1.5×10^8 на каждого реципиента.

Статистическая обработка результатов. Аппроксимацию экспериментальных результатов проводили с помощью программы Origin (компания OriginLab, США) на основе S-образной функции Больцмана вида:

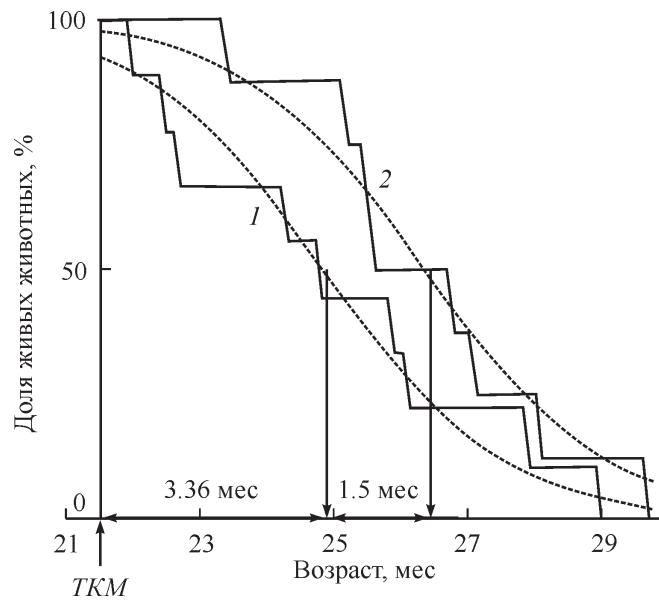
$$F(t) = 100 - \frac{100}{1 + e^{\frac{-t - \tau}{t_0}}},$$

где $F(t)$ — доля особей, доживших до возраста t , от численности экспериментальной группы на момент завершения цикла трансплантаций, τ — продолжительность жизни, соответствующая перегибу кривой выживания (50 % живых), t_0 — пологость кривой выживания (соответствует времени, требуемому для уменьшения популяции вдвое в период максимальной смертности, т. е. в точке перегиба).

Результаты и обсуждение

Вначале нами были подобраны условия массивированной трансплантации клеток костного мозга мышам. Согласно идеи эксперимента, требовалось ввести каждой мыши около 150 млн клеток (1.5×10^8), что составляет примерно четверть общего количества клеток КМ взрослой мыши. Оказалось, что при введении большого объема суспензии клеток (более 1 мл), а также при высокой концентрации клеток в суспензии ($1 \cdot 10^8$ – $1.5 \cdot 10^8$ кл./мл) большая часть мышей гибнет в течение 2–10 мин после трансплантации. Поэтому были выбраны следующие условия трансплантации: клетки вводятся шестью порциями по $2.5 \cdot 10^7$ клеток в объеме 0.5 мл с интервалом 8–16 ч. Важным условием удачной трансплантации оказались добавление в суспензию клеток гепарина в количестве 5 ед. на дозу (2.5×10^7 клеток в 0.5 мл) и тщательная фильтрация клеток непосредственно перед трансплантацией, что позволило значительно снизить посттрансплантационную смертность.

В качестве реципиентов клеток КМ использовали мышей линии C57BL/6 в возрасте 21.5 мес. 10 самкам транспланттировали по $1.5 \cdot 10^8$ клеток, полученных от 6-недельных доноров-самцов этой же линии. При прове-



Влияние массивированной безрадиационной сингенной трансплантации костного мозга на продолжительность жизни мышей C57BL/6.

1 — гистограмма продолжительности жизни животных в контрольной группе (сплошная линия) и ее аппроксимация (штриховая линия), 2 — гистограмма продолжительности жизни животных в группе реципиентов, подвергшихся трансплантации костного мозга (сплошная линия), и ее аппроксимация (штриховая линия). ТКМ — трансплантация костного мозга.

дении трансплантации в каждом случае количество живых клеток КМ превышало 90 %, что определялось подсчетом окрашенных трипановым синим клеток в камере Горяева. Из 10 реципиентов 2 погибли в ходе цикла трансплантаций, предположительно от образования тромбов в крупных сосудах. Эти 2 мыши были исключены из статистической обработки. Оставшиеся 8 мышей наблюдались до их естественной смерти параллельно с контрольной группой из 9 мышей того же возраста, не подвергавшихся трансплантации. На рисунке виден эффект трансплантации КМ на продолжительность жизни: *кривая 2*, соответствующая группе реципиентов, всегда проходит выше, чем *кривая 1* (контрольная группа).

Для сравнительного описания кривых сначала проводили двухпараметрическую аппроксимацию по параметрам τ и t_0 каждой из кривых. В результате было найдено среднее по двум кривым значение $t_0 = 1.4 \pm 0.2$, после чего проводили однопараметрическую аппроксимацию по параметру τ каждой кривой (варiations t_0 не влияют на определение τ). При этом были получены следующие значения τ : $\tau_1 = 24.9 \pm 0.1$, $\tau_2 = 26.4 \pm 0.1$.

Таким образом, средняя продолжительность дожития с начала периода наблюдения (с возраста 21.5 мес) контрольной группы составила $24.9 - 21.5 = 3.4 \pm 0.1$ мес, а экспериментальной — $26.4 - 21.5 = 4.9 \pm 0.1$ мес, что соответствует приросту $4.9 - 3.4 = 1.5 \pm 0.1$ мес. Следовательно, трансплантация КМ, проведенная по описанной методике, привела к увеличению времени дожития на 44 %.

Полученное положительное влияние трансплантации КМ на продолжительность жизни занижено из-за осложнений трансплантации (в том числе закупорка сосудов), от которых, очевидно, пострадали не только 2 погибшие во время трансплантации мыши, исключенные из статистики, но и выжившие, хотя и в меньшей степени. Мы ожидаем большего эффекта в случае использования высококачественных коммерческих фильтров для очистки трансплантируемого материала от агрегатов клеток.

Имеющиеся в литературе данные также говорят о возможном влиянии трансплантации КМ на продолжительность жизни мышей. Так, в 2004 г. была предпринята попытка продлить жизнь мышей сингенной безрадиационной трансплантацией $4 \cdot 10^6 - 10 \cdot 10^6$ клеток КМ молодых доноров (Kamminga et al., 2005). Однако эффект был очень небольшим (менее 10 % времени дожития), вероятно потому, что трансплантировалось сравнительно небольшое количество клеток; результирующий химеризм костного мозга оказался весьма скромным (1—10 %). Однако в том же году другому научному коллективу удалось добиться 30—37 % химеризма (Colvin et al., 2004) после пересадки $2 \cdot 10^8$ клеток КМ без облучения, в точном соответствии с гипотезой свободного замещения стволовых клеток (всего у зрелой мыши около $6 \cdot 10^8$ клеток КМ). Гипотеза свободного замещения Квазенберри (Colvin et al., 2004) предсказывает еще большую эффективность заселения стареющего реципиентного костного мозга молодыми донорскими клетками, поскольку к старости количество собственных клеток КМ реципиента резко снижается. В полном согласии с этим химеризм старых реципиентов в вышеупомянутой работе (Kamminga et al., 2005) превышал химеризм зрелых реципиентов в 10—20 раз (5—10 % против 0.5—1 %), т. е. при увеличении количества донорских клеток в 10—20 раз (от $5 \cdot 10^6 - 10 \cdot 10^6$ до $1 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^8$) следует ожидать практически полного замещения стареющего костного мозга до-

норским. Таким образом, полученные нами данные, свидетельствующие о значительном влиянии трансплантации КМ на продолжительность жизни мышей, могут быть объяснены большим количеством трансплантированных и встроившихся в ткани реципиентов клеток.

Следующим этапом нашей работы станет количественная оценка степени посттрансплантационного химеризма и его корреляции с продолжительностью жизни на большем количестве животных с варьированием как источников циркулирующих стволовых клеток, так и линий реципиентов. Успешное развитие данного направления позволит разработать подходы для терапии не только множества наследственных заболеваний, но и для замедления процесса старения в целом.

Коллектив выражает благодарность коллегам из Университета Техаса, Центр наук о здоровье, Хьюстон (University of Texas, Health Science Center at Houston), докторам Паулю Симмонсу и Наталие Бруард (Drs. Paul Simmons and Nathalie Brouard) за ценные консультации и профессорам Рику Ветселю и Фериду Мураду (Profs. Rick Wetsel and Ferid Murad) за помощь в разработке и осуществлении проекта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.512.11.2086).

Список литературы

- Ковина М. В., Ходарович Ю. М. 2011. Эффективная дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в эндотелийциты методом длительного со-культтивирования с первичной тканевой культурой. В кн.: Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник статей. М.: МАКС Пресс. 189—200.
- Birkenmeier E. H., Barker J. E., Vogler C. A., Kyle J. W., Sly W. S., Gwynn B., Levy B., Pegors C. 1991. Increased life span and correction of metabolic defects in murine mucopolysaccharidosis type VII after syngeneic bone marrow transplantation. Blood. 78 : 3081—3092.
- Colvin G. A., Lambert J. F., Abedi M., Hsieh C. C., Carlson J. E., Stewart F. M., Quesenberry P. J. 2004. Murine marrow cellularity and the concept of stem cell competition: geographic and quantitative determinants in stem cell biology. Leukemia. 18 : 575—583.
- Corti S., Locatelli F., Donadoni C., Guglieri M., Papadimitriou D., Strazzer S., Del Bo R., Comi G. P. 2004. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. Brain. 127 : 2518—2532.
- Gluckman E., Auerbach A. D., Horowitz M. M., Sobocinski K. A., Ash R. C., Bortin M. M., Butturini A., Camitta B. M., Champlin R. E., Friedrich W., Good R. A., Gordon-Smith E. C., Harris R. E., Klein J. P., Ortega J. J., Pasquini R., Ramsay N. K., Speck B., Vowels M. R., Zhang M. J., Gale R. P. 1995. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. Blood. 86 : 2856—2862.
- Grewal S. S., Kahn J. P., Mac Millan M. L., Ramsay N. K., Wagner J. E. 2004. Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis. Blood. 103 : 1147—1151.
- Herzog E. L., Chai L., Krause D. S. 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood. 102 : 3489—3493.
- Iwai H., Lee S., Inaba M., Sugiura K., Tomoda K., Yamashita T., Ikehara S. 2001. Prevention of accelerated presbycusis by bone marrow transplantation in senescence-accelerated mice. Bone Marrow Transplant. 28 : 323—328.
- Kajstura J., Cheng W., Sarangarajan R., Li P., Li B., Nitahara J. A., Chapnick S., Reiss K., Olivetti G., Anversa P. 1996. Ne-

- crotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. Amer. J. Physiol. 271 : H1215—H1228.
- Kamminga L. M., van Os R., Ausema A., Noach E. J., Weersing E., Dontje B., Vellenga E., de Haan G. 2005. Impaired hematopoietic stem cell functioning after serial transplantation and during normal aging. Stem Cells. 23 : 82—92.
- Körbling M., Katz R. L., Khanna A., Ruijgrok A. C., Rondon G., Albitar M., Champlin R. E., Estrov Z. 2002. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. Engl. J. Med. 346 : 738—746.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 126 : 663—676.
- Thiele J., Varus E., Wickenhauser C., Kvasnicka H. M., Metz K. A., Beelen D. W. 2004. Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation. Histol. Histopathol. 19 : 201—209.
- Wagner J. E., Ishida-Yamamoto A., McGrath J. A., Hordinsky M., Keene D. R., Woodley D. T., Chen M., Riddle M. J., Osborn M. J., Lund T., Dolan M., Blazar B. R., Tolar J. 2010. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Engl. J. Med. 363 : 629—639.
- Wang Y., Chen J., Hu J. L., Wei X. X., Qin D., Gao J., Zhang L., Jiang J., Li J. S., Liu J., Lai K. Y., Kuang X., Zhang J., Pei D., Xu G. L. 2011. Reprogramming of mouse and human somatic cells by high-performance engineered factors. EMBO Rep. 12 : 373—378.
- Willenbring H., Bailey A. S., Foster M., Akkari Y., Dorrell C., Olson S., Finegold M., Fleming W. H., Grompe M. 2004. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. Nat. Med. 10 : 744—748.

Поступила 27 VII 2012

LIFE EXTENSION STUDY ON HIGH-YIELD NON-MYELOABLATING BONE MARROW TRANSPLANTATION FROM YOUNG TO OLD MICE

M. V. Kovina,^{1,*} V. A. Zuev,² G. O. Kagarlitskiy,³ Yu. M. Khodarovich³

¹ A. N. Bach Institute of Biochemistry RAS,

² N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology

and ³ M. M. Shemyakin and Y. A. Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute RAS, Moscow;

* e-mail: gershi2001@yahoo.com

Tissue renewal is the known phenomenon, when the progeny of resident or circulated stem cells (SC) replaces the vanishing cells. The delivery of stem cells via circulation should result in stem cell homing and differentiation into wide variety of tissues and gives promise as therapy for many diseases of tissue failure including aging itself. To test this hypothesis, we created chimeric mice C57BL/6 by bone marrow (BM) transplantation from young 1.5 months old donors to 21.5-months old recipient mice of the same strain C57BL/6. We applied here the recently published new transplantation technique, which allows to get high scores of chimerism due to very high amount of transplanted cells ($1.5 \cdot 10^8$ per mouse or 25 % of its total BM count). In the earlier works only 1 % of total BM count (about $5 \cdot 10^6$ cells per mouse) was usually transplanted to lethally irradiated mice, what excluded the possibility to apply this method for life extension. As a result of the modified technique implementation, the mean post-transplantation life (starting the 21.5 months old) of treated mice was 4.9 months versus 3.4 months for untreated mice. The difference in 1.5 months counts for 44 % extension of mean post-transplantation life.

Key words: high-yield non-myeloablating bone marrow transplantation, stem cell, longevity, life extension.