

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЗАЩИЩАЮТ ОТ ОСТРОЙ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ: ПОНИМАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ

Claudia Lange

MESENCHYMAL STROMAL CELLS PROTECT FROM ACUTE RADIATION SYNDROMES: INSIGHTS INTO POSSIBLE MECHANISMS

Университетский госпиталь Гамбург–Эппендорф (Германия, г. Гамбург, ул. Мартини, д. 52)
Clinic for Stem Cell Transplantation, Department Cell and Gene Therapy,
University Hospital Hamburg-Eppendorf (Germany, Hamburg, Martini str., 52)

Успех лечения острой лучевой болезни заключается в немедленной поддерживающей терапии. У пациентов с ограниченным кроветворным потенциалом единственным выходом остается трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Мы предполагаем, что альтернативой для пострадавших от облучения пациентов может служить терапия мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Эксперименты *in vitro* по дифференцировке МСК человека (чМСК) в клетки-предшественники ГСК и эндотелий показали, что МСК меняют свою морфологию и профиль экспрессии генов, и, по-видимому, имеют гемопоэтический потенциал. Мышечные МСК (мМСК) были получены из костного мозга, помечены eGFP и клонированы. Летально облученным мышам были внутривенно введены меченые МСК. Мы обнаружили длительную выживаемость реципиентов с восстановлением гемопоэза после трансплантации исключительно МСК, без вклада ГСК. Анализ количественной полимеразной цепной реакции химеризма выявил меченые клетки в периферической крови сразу после введения и в легких через 24 ч. Однако на поздних сроках донорских клеток не было обнаружено ни в одной из исследованных тканей. Несмотря на быстрое исчезновение донорских клеток, микрочиповый и анализ полимеразной цепной реакции выявили в костном мозге признаки регенеративного характера, проявляющиеся в снижении воспаления, адгезии и формирования матрикса, и в увеличении противовоспалительных и антиоксидативных явлений, сравнимых с трансплантацией ГСК. Мы также показали, что введение секреторируемых МСК-микровезикул имеет такой же защитный эффект, как введение клеток. В соответствии с нашими результатами можно предположить, что МСК посредством секреции трофических факторов и модулирования активности ниш ГСК защищают эндогенный гемопоэз и могут выступать в роли быстрого и эффективного средства первой помощи при индуцированной облучением кроветворной недостаточности.

Ключевые слова: радиация, радиобиология, острая лучевая болезнь, костный мозг, гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стромальные клетки, гемопоэз, радиационное облучение.

Successful treatment of acute radiation syndromes relies on immediate supportive care. In patients with limited hematopoietic recovery potential, hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is the only curative treatment option. We propose MSC treatment as an alternative treatment for severely radiation-affected individuals. *In vitro* differentiation of human MSC (hMSC) into progenitors for hematopoietic and endothelial cells revealed that MSC changed their morphology and gene expression profile, suggesting that investigated cells possess hematopoietic capacity *in vitro*. Mouse mesenchymal stromal cells (mMSCs) were expanded from bone marrow, retrovirally labeled with eGFP (bulk cultures) and cloned. Lethally irradiated recipients were *i.v.* transplanted with bulk or clonal mMSCs. We found a long-term survival of recipients with fast hematopoietic recovery after the transplantation of MSCs exclusively without support by HSCs. Quantitative PCR based chimerism analysis detected eGFP-positive donor cells in peripheral blood immediately after injection and in lungs within 24 hours. However, no donor cells in any investigated tissue remained long-term. Despite the rapidly disappearing donor cells, microarray and quantitative RT-PCR gene expression analysis in the bone marrow of MSC-transplanted animals displayed enhanced regenerative features characterized by decreased proinflammatory, ECM formation and adhesion properties and boosted anti-inflammation, detoxification, cell cycle and anti-oxidative stress control as compared to HSC transplanted animals. We could show that injection of MSC-derived microvesicles resulted in a similar protection as MSC transplantation. Our results suggest that MSCs, their release of trophic factors and their HSC-niche modulating activity rescue endogenous hematopoiesis thereby serving as fast and effective first-line treatment to combat radiation-induced hematopoietic failure.

Keywords: radiation, radiobiology, acute radiation sickness, bone marrow, hematopoietic stem cells, mesenchymal stromal cells, hematopoiesis, irradiation.

Ланге Клаудия – д-р философии, отд. клеточной и генной терапии клиники трансплантации стволовых клеток Университетского госпиталя Гамбург–Эппендорф, Германия (Germany, 20246, Hamburg, Martini str., 52); e-mail: cl.lange@uke.de.

Lange Claudia – PhD, Clinic for Stem Cell Transplantation, Dept. Cell and Gene Therapy, University Hospital Hamburg–Eppendorf (Germany, 20246, Hamburg, Martini str., 52); e-mail: cl.lange@uke.de.

Введение

Терапия пациентов с острой лучевой болезнью (ОЛБ) по-прежнему остается большой проблемой. Восстановление гемопоэза при индуцированной облучением костно-мозговой недостаточности зависит от полученной дозы и интенсивности поддерживающей терапии, призванной защитить от летальных инфекций и обеспечить сохранившимся стволовым клеткам поддержку для размножения. Для того, чтобы достичь оптимальной эффективности и обеспечить наилучшую терапию пострадавшим, получившим облучение в результате террористических актов и техногенных катастроф, медицинские мероприятия должны быть осуществлены в первые дни после инцидента [7]. Полный спектр мероприятий включает поддерживающую терапию, терапию ростовыми факторами в первые 2 нед после воздействия радиации или трансплантацию костного мозга (ТКМ) / гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Так как эффект от радиационного облучения на стволовые клетки крови приходится на дозы значительно меньше, чем на клетки других критических органов, то быстрое изменение состава клеток периферической крови диктует основные терапевтические меры. Фактически тотальное облучение тела человека в дозах более 7–8 Гр приводит к полному опустошению костного мозга (КМ). До этого порогового значения спонтанное восстановление гемопоэза за счет сохранившихся стволовых клеток и клеток-предшественниц возможно в течение 30–50 дней, однако этот период характеризуется панцитопенией: снижением числа гранулоцитов, тромбоцитов и эритроцитов.

ТКМ производится в случае необратимого повреждения пула гемопоэтических стволовых клеток. Интересно, что даже после тотального облучения тела радиорезистентные стволовые клетки были обнаружены в различных зонах КМ, составляя пул остаточных стволовых клеток и клеток-предшественниц [11]. ОЛБ характеризуется не только повреждением костного мозга. Мишенями облучения становятся различные органы, что приводит к значительному выбросу воспалительных цитокинов [3], сравнимому с феноменом «цитокинового шторма», описанного при реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) [6].

У выживших жертв атомных бомбардировок были зафиксированы пролонгированные эффекты ионизирующего излучения в виде постоянных признаков воспаления [10]. В дополнение к этому свой вклад в общую смертность вносит оксидативный стресс. Терапия

Introduction

The management of patients suffering from acute radiation syndromes (ARS) still remains a major challenge. Survival of radiation-induced bone marrow failure depends on the dose of radiation received and the intensity of supportive care which can protect from otherwise lethal infection and give surviving stem cells a chance to expand. To provide the best possible care for radiation accident victims in acts of terrorism or catastrophic incidences, medical countermeasures need to be made within the first few days for optimal efficacy [7]. Overall measures include supportive care, treatment with growth factors within the first two weeks after radiation exposure, or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Since radiation effects on blood stem cells occur at doses generally lower than on other critical organs, the rapidly emerging changes in the peripheral blood cell lineages dictate the treatment options. In fact, total body irradiation (TBI) at doses more than 7–8 Gy in human corresponds to medullar eradication. Under this threshold spontaneous recovery from residual hematopoietic stem and progenitor cells may be expected within 30–50 days but going through cytopenic phases of granulocytic, megakaryocytic and erythrocytic lineages.

HSCT should be considered if the victim's hematopoietic stem cell (HSC) pool is essentially irreversibly damaged. Interestingly, even after TBI, intrinsically radioresistant stem cells have been detected in distinct bone marrow (BM) areas comprising a residual hematopoietic stem and progenitor cell pool [11]. ARS does not only imply damage to the bone marrow. Different target organs are affected, resulting in a significant release of inflammatory cytokines [3] comparable to that of acute graft-versus-host disease (GvHD) with the observed "cytokine storm" [6].

Long-term effects of ionizing radiation have been documented in atomic bomb survivors with persistent signs of inflammation [10]. Additionally, oxidative stress after high dose ionizing radiation has been involved in delayed morbidity. Management of ARS therefore relies on tissue damage repair processes that might be supported by therapies directed at mitigation of inflammation [11].

Efforts to improve outcome for affected individuals focus on the stem cell niche. Therefore, visionary therapies should augment niche activity to accelerate hematopoietic recovery in vivo. One integrative part of the BM stroma are the mesenchymal stromal cells (MSC), also described as osteoblastic progenitors [8]. The niche stromal

ОЛБ основывается на репаративных процессах в поврежденных облучением тканях, которые могут быть поддержаны мерами, направленными на снижение воспалительных реакций [11]. Усилия по улучшению терапевтических результатов сфокусированы на нишах стволовых клеток. Следовательно, терапия должна увеличить активность ниш для того, чтобы ускорить восстановление кроветворения *in vivo*.

Одним из компонентов стромы КМ являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), также описанные в качестве остеогенных предшественников [8]. Стромальные клетки окружают ГСК, создавая микроокружение, которое обеспечивает поддержание и самообновление ГСК, экранируя последние от стимулов дифференцировки и апоптоза. Состояние покоя ГСК обеспечивается посредством поддержания их в стадии G0 клеточного цикла; пролиферация, дифференцировка и выход ГСК в васкулярную нишу могут регулироваться костно-мозговыми стромальными клетками [25]. Таким образом, физиологическая функция МСК состоит не в прямом замещении тканей мезенхимного происхождения, таких как кость, их первичная и наиболее значимая функция заключается в поддержании защитного и регенеративного микроокружения для ГСК.

В клинической практике было показано, что МСК влияют на острую органную недостаточность. При совместных трансплантациях с ГСК МСК стимулируют восстановление кроветворения после химио- и лучевой терапии, значительно сокращая время полного гемопоэтического и частично тромбоцитарного восстановления [12]. В дополнении к этому существуют большое количество фактов, подтверждающих эффективность МСК при терапии стероид-устойчивой РТПХ без каких-либо побочных эффектов, даже если МСК происходят из КМ не донора, а третьего лица [17]. Наконец, МСК секретируют целый спектр биологически активных молекул [21], среди них несколько основных гемопоэтических факторов роста, включая ИЛ-6, ИЛ-11, фактор ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF), фактор стволовых клеток (stem cell factor, SCF), лиганд Flt3 (Flt3 ligand); факторы, обладающие иммуномодулирующим свойством, например трансформирующий фактор роста бета1 [TGF- β 1, простагландин E2 (prostaglandin E2), индоламин 2,3-диоксигеназа (indoleamine 2,3-dioxygenase)] и др. [20]. Таким образом, МСК являются подходящим кандидатом на роль регулятора активности гемопоэтической ниши.

cells surround the HSC and their progeny, thus providing a sheltering microenvironment that supports the maintenance and self-renewal of HSC by shielding them from differentiation and apoptotic stimuli. The regulation of HSC quiescence, through the maintenance of HSC in the G0 phase of the cell cycle in the endosteal niche, and the control of HSC proliferation, differentiation and recruitment in the vascular niche can be ascribed to bone-marrow stromal cells [25]. Thus, the physiological function of MSC is not the direct replacement of mesenchymal tissues such as bone, but their primary and most important function is to establish a protective and regenerative microenvironment for HSC.

Clinically, MSC have been proven to intervene with acute organ impairments. Cotransplanted with HSC, MSC augment hematopoietic recovery after chemo- or radiotherapy significantly decreasing the time to full hematopoietic and particularly platelet reconstitution [12]. Additionally, there is a large body of evidence for MSC effectiveness in the treatment of steroid resistant GvHD without any side effects even when obtained from BM of third-party donors [17]. Finally, MSC secrete a plethora of bioactive molecules [21]. Among these, several essential hematopoietic growth factors including IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), stem cell factor (SCF) and Flt3 ligand are produced but also factors with immunomodulatory effects, e.g. transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), prostaglandin E2, indoleamine 2,3-dioxygenase, and others [20]. Therefore, MSC might be a good candidate for the modulation of hematopoietic niche activity.

In summary, MSC have emerged as a promising therapeutic tool for tissue regeneration and repair. Further clinical interest has been raised by the observation that MSC are immunoprivileged and might be used from unreleated, i.e. allogeneic donors [20, 25]. Altogether, we assumed that MSC with their comprehensive trophic potential could serve as a readily available treatment option after severe radiation exposure.

Methods and Results

In vitro differentiation of human MSC (hMSC). As first experiments, we investigated the capability of BM-derived MSC to differentiate into progenitors for hematopoietic (HSC) and endothelial cells (EC). Human MSC were thoroughly characterized according to the ISCT (International Society for Cellular Therapy) criteria [5], comprising flow cytometry and differentiation capability into three mesodermal lineages [14]. To avoid any contamination of MSC with HSC, cloned cells

Суммируя, можно сказать, что МСК выступают многообещающим терапевтическим средством для регенерации и репарации тканей. Клинический интерес к МСК возрос после обнаружения того факта, что МСК являются иммунопrivилегированными клетками и могут использоваться в неродственных (аллогенных) трансплантациях [20, 25]. Все эти качества МСК совместно с их широким трофическим потенциалом позволяют рассматривать стромальные клетки как готовое и доступное средство терапии после радиационного облучения.

Методы и результаты

Дифференцировка МСК человека (чМСК) *in vitro*. Исследовали способности МСК костного мозга дифференцироваться в клетки-предшественницы ГСК и эндотелия. МСК человека были охарактеризованы в соответствии с критериями Международного общества по клеточной терапии [5], включающими цитометрические характеристики и способности дифференцироваться в 3 мезодермальных направлениях [14]. Чтобы избежать контаминации культуры МСК гемопоэтическими клетками, использовали исключительно клонированные клетки. Клонированные МСК дифференцировали в направлении: 1) гемопоэтическом, используя ростовые условия, с добавлением/без добавления сыворотки; 2) эндотелиальных клеток [16].

Фибробластоподобные МСК (рис. 1а) формировали клетки, похожие на бласты с заметным уменьшением диаметра от изначального ($28,9 \pm 6,6$) до ($15,7 \pm 3,5$) мкм – в процессе дифференцировки в гемопоэтическом (рис. 1b) и эндотелиальном (рис. 1c) направлениях.

Условия культивирования привели к формированию кластеров – эквивалентов стромальных структур *in vitro*, из которых начинается дифференцировка. В клетках, дифференцированных в гемопоэтическом направлении, изменилась экспрессия генов в направлении профиля, типичного для ранних предшественников (CD117, CD133, CD45) и зрелых гемопоэтических клеток [CD14, CD16, гликофорин А (glycophorin GlyA), CD31, podoplanin PDPN] (рис. 2а).

Интересно, что экспрессия рецептора эритропоэтина возросла практически во всех клонах и при всех используемых условиях культивирования, что свидетельствует об определяющей роли эритропоэтина в пролиферации и дифференцировке предшественников мезодермального происхождения. Кроме того, в условиях культивирования в присутствии сыворотки также возросла экспрессия раз-

were used exclusively. Cloned human MSC were subjected to differentiation into (i) hematopoietic cells using serum-containing or serum-depleted growth conditions and (ii) endothelial cells (for methodical details see ref. [16]).

Fibroblastoid MSC (Fig. 1a) formed blast-like cells with noticeably decreased diameter from originally (28.9 ± 6.6) to (15.7 ± 3.5) μm during the differentiation into hematopoietic (Fig. 1b) and endothelial (Fig. 1c) lineages.

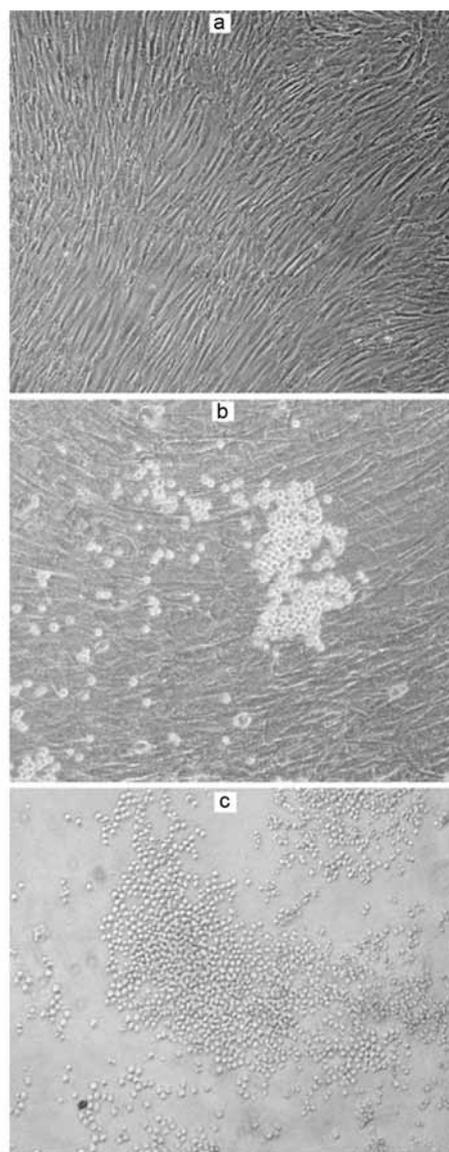


Рис. 1. Культура клональной чМСК во время экспансии (а), дифференцировки в гемопоэтические (b) или эндотелиальные (c) клетки.

Fig. 1. Human MSC display a fibroblastoid morphology during *in vitro* expansion but form blast-like cells after induction of differentiation. One clonal hMSC culture is shown during expansion (a), differentiation into hematopoietic (b) or endothelial (c) cells.

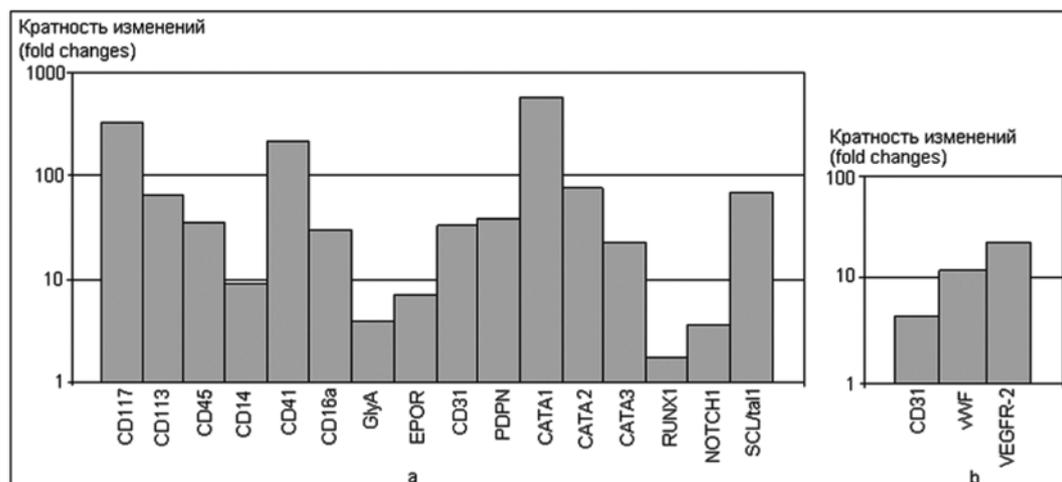


Рис. 2. Кратность изменения экспрессии указанных гемопоэтических (а) и эндотелиальных (б) генов после дифференцировке при сравнении с недифференцированными МСК.

Fig. 2. Human MSC significantly upregulate expressions of hematopoietic and endothelial genes after induction of differentiation. Shown are the fold changes of gene expression of indicated hematopoietic (a) and endothelial (b) genes after differentiation compared to undifferentiated hMSC.

личных транскрипционных факторов, ответственных за эритропоэз (SCL/tal1), эритромегакариопоэз (GATA1, GATA2), лимфопоэз (GATA3) и миелопоэз (NOTCH1, RUNX1). Так как SCL и RUNX1-транскрипционные факторы, определяющие формирование ГСК посредством линейной спецификации [9], мы сделали предположение об индукции данного пути дифференцировки в МСК.

С помощью метода иммунофлуоресценции маркеров стволовых и зрелых гемопоэтических клеток (данные не приводятся, см. [16]) были выявлены антиген-позитивные клетки с маленькими круглыми или полиморфными ядрами с экспрессией маркеров на низком уровне. Параллельно эти же самые клетки при культивировании с эндотелиальными факторами продемонстрировали морфологию эндотелиальных клеток и способность к экспрессии характерных для данной дифференцировки генов (рис. 2b). На белковом уровне были выявлены клетки, позитивные по одновременной двойной окраске на маркеры CD31/WWF (фактор фон Виллебранда – von Willebrand factor) и VEGFR-2 (васкулярный эндотелиальный фактор роста)/CD34 [16].

Для гемопоэтических и эндотелиальных предшественников характерна экспрессия определенного набора генов, включая VEGFR-2, CD34, SCL, GATA2, RUNX1 и CD31. Можно предположить, что исследуемые МСК человека имеют *in vitro* гемопоэтический потенциал, и использование нехарактерных факторов в качестве регуляторов линейной

The *in vitro* conditions led to cluster formation appearing as an *in vitro* equivalent of stromal structures from which differentiation proceeded. Hematopoetically differentiated cells changed their gene expression towards a typical profile of progenitor (CD117, CD133, CD45) and mature (CD14, CD16, glycoporphin GlyA, CD31, podoplanin PDPN) hematopoietic cells (Fig. 2a).

Interestingly, the erythropoietin receptor (EPOR) was upregulated in almost all clones and under all conditions suggesting a definite role for EPO in proliferation and differentiation of mesodermal progenitors. Additionally, a variety of transcription factors responsible for erythropoiesis (SCL/tal1), erythro-megakaryopoiesis (GATA1, GATA2), lymphopoiesis (GATA3), and myelopoiesis (NOTCH1, RUNX1) were upregulated upon serum-containing differentiation. As SCL and RUNX1 are transcription factors essential for HSC formation by instructing lineage specification [9] we hypothesized an efficient induction of this differentiation pathway in MSC.

Using immunofluorescence, antigen-positive cells with small round or polymorphic nuclei were detected showing the expression of hematopoietic progenitor and mature antigen expression (not shown, refer to ref. [16]), albeit to a rather low degree. In parallel, the same cells were able to acquire endothelial morphology and expressed endothelial genes upon cultivation with endothelial promoting factors (Fig 2b). At the protein level, single double positive cells for CD31/WWF (von Willebrand factor) and VEGFR-2/CD34 were detected [16].

направленности может играть определяющую роль в процессе дифференцировки. Самой значительной дифференцировки удалось достичь в культурах, где МСК приняли на себя функцию стромы, направляя незначительную часть клеток в дифференцировку.

На основе результатов, полученных *in vitro*, мы заключили, что МСК могут восстановить систему гемопоэза. Гипотетически одна плюрипотентная клетка способна спасти летально облученный организм, но в реальности необходимо около 6 клеток [13], т.е. может быть достаточно шести плюрипотентных МСК с соответствующим потенциалом.

МСК способствуют восстановлению гемопоэза после летального облучения. Для того, чтобы протестировать способности МСК восстанавливать кроветворение летально облученным (7–8 Гр) самкам мышей линии C57Bl/6J-CD45.1, были внутривенно введены меченные eGFP клетки сборной культуры мышинных МСК (mMSC) самцов в количестве 10⁶. Восстановление лейкоцитов и тромбоцитов было сравнимо с таковым при трансплантации ГСК (рис. 3), при котором нормализация лейкоцитов достигается к 4-й неделе. Состояние реципиента и распределение в популяции кроветворных клеток приходят в норму 6–8 нед спустя (табл. 1). Установлено по окраске мазков по Pappenheim.

Похожие опыты были проведены с клонированными mMSC, среди которых один клон (IXH8) показал наилучшие способности, влияющие на выживаемость животных (табл. 2). Знаменательно, что этот клон был морфологически отличен от других культур МСК, с повышенной экспрессией CD34 и CD45, но не CD105. Культуры eGFP трансдуцирован-

Hematopoietic and endothelial progenitors share expression of a number of genes, including VEGFR-2, CD34, SCL, GATA2, RUNX1, and CD31, suggesting that investigated hMSC possess hemangioblastic capacity *in vitro*, and the extrinsic factors used might play a decisive role in the differentiation process as lineage-instructive regulators. Most potent differentiation was achieved in cultures where the majority of hMSC adopted stroma function instructing a minor part to differentiate.

From the *in vitro* results we concluded that MSC might reconstitute the hematopoietic system. Hypothetically, one pluripotent stem cell would suffice to rescue lethally irradiated hosts, however in reality approx. 6 cells are needed [13], i.e. six pluripotent MSC with the respective potential might suffice.

MSC promote hematopoietic recovery after lethal irradiation. To test the *in vivo* capability of MSC to replenish the hematopoiesis after eradication, lethally irradiated female recipients of the C57Bl/6J-CD45.1 strain were *i.v.* transplanted with 10⁶ eGFP-marked male bulk-culture mouse MSC (mMSC). Leukocyte and thrombocyte recovery was similar to recipients transplanted with HSC (Fig. 3) reaching normalization of white blood cells after 4 weeks. Seven months later, the recipients were hematologically well with a normal distribution of peripheral cell populations (Tab. 1) estimated using Pappenheim-stained blood smears. Similar experiments were carried out with clonal mMSC showing one clone (IXH8) with superior survival promoting properties. Impressively, clone IXH8 was morphologically different from all other cultures showing increased CD34 and CD45 but no CD105 expression (Tab. 2).

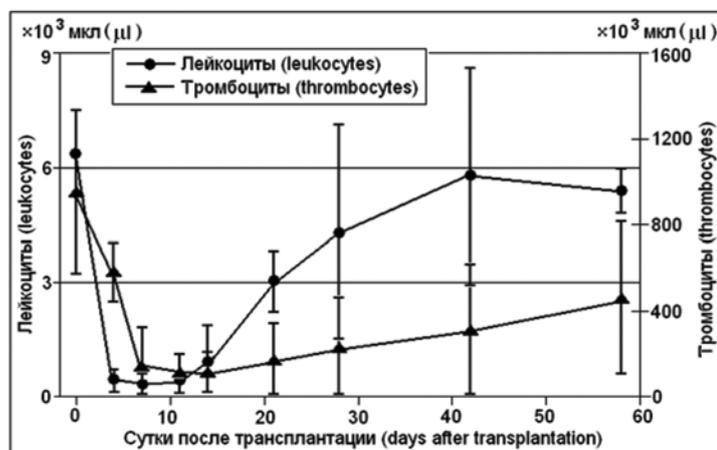


Рис. 3. Мышиные МСК спасают после тотального облучения тела.

Fig. 3. Mouse MSC rescue mice after total body irradiation.

Таблица 1

Популяция клеток периферической крови животных через 5 мес после трансплантации мМСК

Table 1. Peripheral blood cell populations after 5 months in mMSC transplanted animals

Клетки крови (blood cells) (M ± σ) %			
лимфоциты (lymphocytes)	нейтрофилы (neutrophils)	моноциты(monocytes)	эозинофилы(eosinophils)
72 ± 3	21 ± 3	5 ± 2	2 ± 1

Таблица 2

Фенотип мМСК и выживаемость реципиентов после трансплантации

Table 2. Phenotypical characterization of mMSC (%) and recipients' survival rates after transplantation

Клетки (cells)	CD34	CD45	CD59	CD90	CD105	CD117	Sca-1	Выживаемость через 7 мес (survival at 7 months)(%)
Bulk	1.6	0.5	95.4	0.5	85.9	0.9	96.7	19/28 (67.9)
IXH8	9.8	4.1	97.4	2.7	1.6	1.5	99.2	15/17 (88.2)
IVH7	1.2	1.3	54.7	0.5	94.1	2.8	81.9	2/12 (16.7)
IXC2	0.9	2.2	79.6	1.2	94.0	1.5	90.2	3/10 (30.0)
VIIIЕ7	1.2	1.1	71.1	2.0	93.1	1.5	96.4	4/10 (40.0)
VF10	2.2	2.2	45.9	0.7	74.0	3.4	77.9	3/10 (30.0)
Контроль (radiation control)	-	-	-	-	-	-	-	0/15 (0.0)

ных сборных и клонированных мМСК после экспансии были позитивны по CD59, CD105 и Sca-1 и негативны по гемопозитическим маркерам CD34, CD45, CD117 и CD90. Клон IXH8 отличался от других культур по экспрессии CD34/CD45 и отсутствию CD105 (в табл. 2 выделено п/ж шрифтом). Трансплантация этого клона привела к наибольшей выживаемости облученных животных, предположительно повышенный уровень CD34 и CD45 и отсутствие CD105 могут быть предпосылкой для более высоких репопуляционных способностей МСМ.

Трансплантированные донорские клетки обнаруживаются на ранних, но не на поздних сроках. Для определения химеризма периферическая кровь, костный мозг и клетки тимуса реципиента были проанализированы методом проточной цитометрии с использованием антител CD45.2. Интересно, что клеток, позитивных по CD45, на разных сроках выявлено не было, это означает, что регенерация не была опосредована донорскими клетками.

Y-хромосомный анализ химеризма с использованием специфического праймера Y-хромосом для количественной полимеразной цепной реакции не смог выявить донорских клеток ни в одной из исследуемых тканей, включая КМ и периферическую кровь, хотя выживаемость животных была увеличена.

Спектральное кариотипирование клональных МСК показало отсутствие Y-хромосом (рис. 4), при этом сборные мМСК, вплоть до 13-го пассажа, были Y-позитивными (данные не приводятся). По-видимому, МСК могут терять

Transplanted donor cells are detectable short-but not long-term. To detect donor chimerism in recipients, we stained recipient peripheral blood (PB), BM and thymus cells with CD45.2 antibodies and carried out flow cytometry. Interestingly, no CD45.2-positive cells were found at any time point, thus not showing regeneration through donor cells.

Y-chromosome-based chimerism analysis in female recipients using specific Y-chromosome primers for quantitative PCR could not detect donor cells in any investigated tissue including PB and BM (not shown), although animals survived long-term. Spectral karyotyping of clonal mMSC detected the loss of the Y-chromosome (Fig. 4), whereas bulk cultures of passage13 were still Y-positive (not shown). Thus, mMSC might lose sex-specific chromosomes.

Next, we used eGFP-specific primers for quantitative PCR-based donor cell detection. Primers for stably integrated eGFP-sequences however also failed to detect any donor cells and no eGFP-positive cells were found in PB, BM or thymus by flow cytometry (not shown). Our results support the concept of impaired transplantability of expanded MSC [19] but also challenge the hypothesis of high plasticity of MSC [1].

The distribution kinetics of eGFP⁺-donor cells after i.v. transplantation supported the fast disappearance from PB, reaching ca. 2 % after 8 hours and no cells at d10 (Fig. 5a). In contrast, mMSC trapped in lungs quickly (Fig. 5b), however without long-term residence and embolization as shown by lack of donor signals

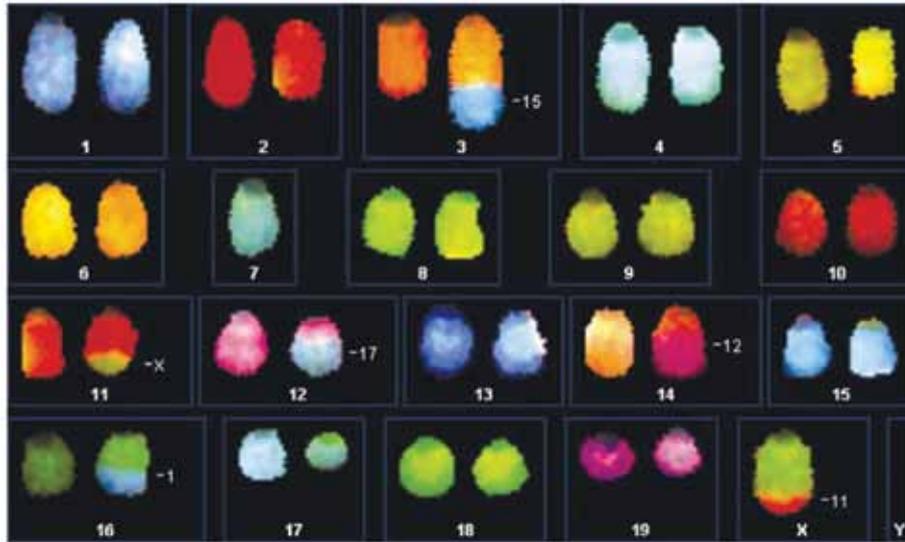


Рис. 4. Спектральное кариотипирование мМСК. Показан анализ клона IXH8. Анализ отдельных диплоидных метафаз выявил отсутствие Y-хромосом, и это наблюдали во всех проанализированных метафазах.

Fig. 4. Spectral karyotyping of mMSC. Shown is the SKY analysis of clone IXH8. SKY analysis of a representative diploid metaphase revealed the loss of the Y-chromosome and this has been observed in all metaphases analyzed.

половые хромосомы. Далее мы использовали eGFP-специфический праймер для количественного определения донорских клеток. Праймеры со стабильно интегрированными eGFP-последовательностями также не смогли обнаружить ни в донорских клетках, меченных eGFP-позитивными клетками, ни в КМ, ни в периферической крови, ни в тимусе (данные не приводятся). Наши результаты поддержи-

after d10. Accordingly, no donor cells were evident in the spleen, liver, BM (Fig. 5b), aorta, kidney, intestine, fat, thymus or lymph nodes (not shown).

Although we did not find donor derived MSC in the BM, the morphology of this organ was preserved by MSC transplantation showing a normal distribution of different compartments (Fig. 6). Without MSC, adipocytes seem to

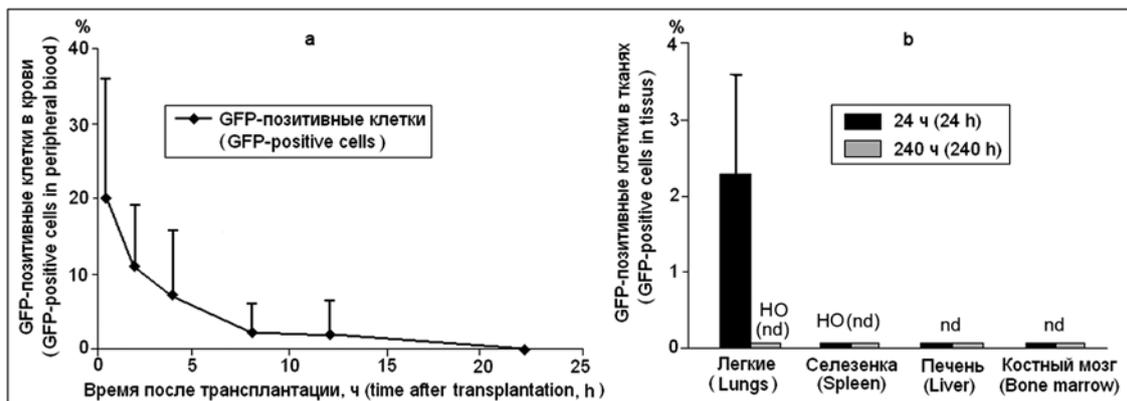


Рис. 5. Донорские мМСК не выявляются на длительных сроках.

a – отслеживание eGFP-меченых клональных IXH8 МСК после трансплантации показало их быстрое снижение в периферической крови. Приблизительно 2 % выявлено в периферической крови в течение 8 ч и полное отсутствие – через 10 дней (n = 8 для каждого срока); b – МСК накапливались в легких в течение 24 ч и исчезли за 10 дней (240 ч). Селезенка, печень и костный мозг не содержали метки на сроках 1 и 10 дней (HO – не обнаружено).

Fig. 5. Donor mMSC are not detectable long-term.

a – tracking of eGFP-labeled clonal IXH8 donor mMSC after transplantation revealed a fast decrease in peripheral blood (PB). Within 8 hours, approx. 2 % were quantified in PB and none after 10 days (n = 8 for each time point); b – mMSC accumulated in Lungs within 24 h and disappeared within 10 days (240 h). Spleen, Liver and BM were negative at d1 and d10 (nd – not detected).

вают концепцию о сниженной трансплантационной способности размноженных МСК [19], но также оспаривают гипотезу об их высокой пластичности [1].

Кинетика распределения eGFP⁺-донорских клеток после внутривенного введения демонстрирует быстрое исчезновение клеток из периферии, достигая 2 % через 8 ч, и их полное отсутствия через 10 дней (рис. 5а). Клетки быстро накапливаются в легких, однако без длительного заселения и эмболизации, как было показано по отсутствию донорского сигнала через 10 дней. Соответственно никаких донорских клеток не было выявлено в следующих органах: селезенка, КМ, печень (рис. 5b), аорта, почки, кишечник, жировая ткань тимус и лимфатические узлы (данные не приводятся).

Хотя донорских клеток в КМ не было найдено, но морфология данного органа демонстрирует защитное действие трансплантированных МСК с нормальным распределением различных компонентов гемопоэтической костной ткани (рис. 6). Без трансплантации МСК количество адипоцитов в костном мозге быстро увеличивается, что сопровождается нарушением структуры КМ.

МСК изменяют экспрессию генов КМ. Хотя донорские мМСК не заселяют КМ реципиен-

take over within short time, thus destroying the marrow structure.

MSC change the BM gene expression. While donor mMSC did not home to the BM, we observed a long term survival and assumed an influence of MSC on the BM function. Therefore we carried out microarray analysis of bone marrow from MSC transplanted animals and compared the gene expressions to that of HSC-transplanted animals and aged matched controls [16]. The gene expression profile in BM changed significantly, clustering as separate group compared to untreated BM or HSC-transplanted mice. Validation of selected genes with high variance proved the beneficial role of MSC in endogenous hematopoietic reconstitution [16]. MSC in a complex mechanism upregulated protection from oxidative stress, cell cycle, anti-inflammatory and detoxification processes (e.g. gene expressions of BRPK, Cdkn1a, Thbs2, Gstm5) whereas lymphoid development, proinflammation, protein degradation and adhesion/matrix formation for improved cell motility (e.g. gene expressions of Vpreb1, Rag2, Klk6, Klk1b5, Uchl1, Sykb, Gpam, Col5a3, Emid1) were downregulated [16]. Summarising the microarray expression data we showed the upregulation of genes which are beneficial to the reconstitution of the BM

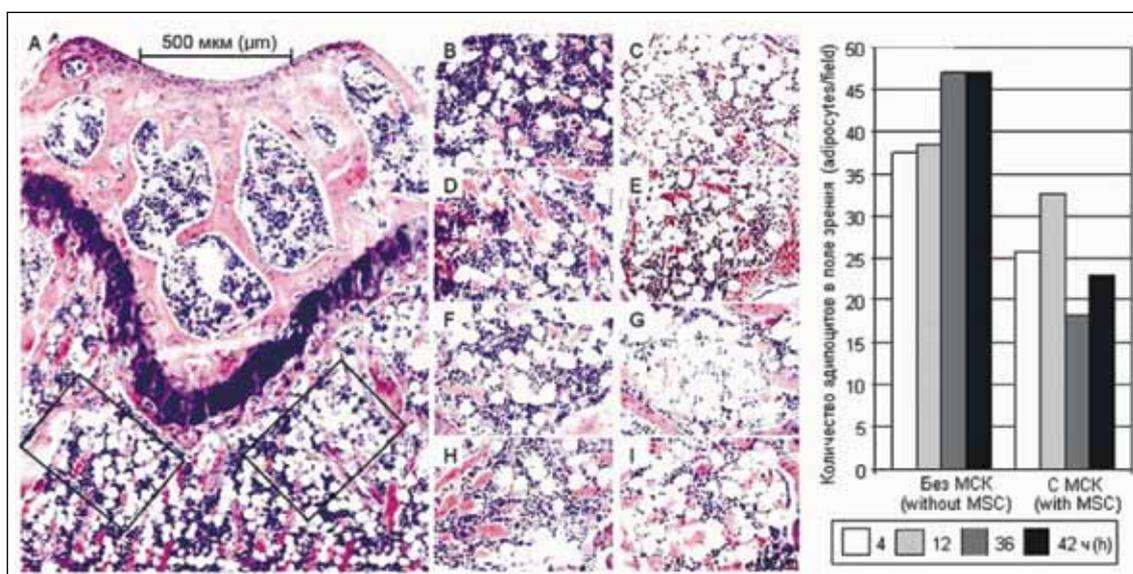


Рис. 6. Гистология КМ при наличии и без трансплантации МСК.

Парафиновые блоки длинных костей контрольных животных и животных с трансплантированными МСК были нарезаны, и количество адипоцитов подсчитывалось в 2 зонах (А) в каждой кости от мыши с МСК трансплантацией через 4(В), 12 (D), 24 (F) и 36 (H) ч или без МСК (С, Е, G и I соответственно). Справа – количество адипоцитов на каждом сроке.

Fig. 6. Histomorphology of BM with and without MSC transplantation.

Paraffin embedded long bones from MSC-transplanted or control animals were cut and the number of adipocytes counted in 2 designated areas (A) per bone from mice with MSC transplantation after 4 (B), 12 (D), 24 (F) and 36 (H) hours or without MSC transplantation (C, E, G, and I, respectively). The right figure shows the number of adipocytes at each time point.

та, мы выявили их влияние на выживаемость и предположили, что МСК влияют на функции КМ. Поэтому мы провели микрочиповый анализ КМ после трансплантации МСК и сравнили профили экспрессии генов КМ после ГСК трансплантации и КМ контрольного животного того же возраста. Профиль экспрессирующихся генов в группе МСК-терапии значительно отличался, формируя отдельный кластер. Проверка сильно различающихся генов подтвердила пользу МСК при эндогенном восстановлении кроветворения [16]. МСК в своем комплексном действии оказывали положительное влияние на защиту от оксидативного стресса, на процессы клеточного цикла, воспаления и детоксикации (экспрессия генов *BRPK*, *Cdkn1a*, *Thbs2*, *Gstm5*), в то время как провоспалительные процессы, процессы лимфопоэза, деградации протеинов, адгезии/формирования матрикса под влиянием МСК угнетались (экспрессия генов *Vpreb1*, *Rag2*, *Klk6*, *Klk1b5*, *Uchl1*, *Sykb*, *Gpm*, *Col5a3*, *Emid1*) [16]. Суммируя данные анализа экспрессии генов, мы показали, что положительная регуляция выявлена у генов, полезных для реконструкции КМ, в то время как гены, предположительно связанные с вызванным радиацией опустошением КМ, подавлялись (рис. 7).

Возможный паракринный механизм МСК. Вопрос, как МСК, будучи запертыми в легких, транслируют свой регенеративный эффект на КМ, остается открытым. Мы смогли показать, что введение микровезикул, выделенных из МСК, имеет защитный эффект, сравнимый с действием клеток (рис. 8). Микровезикулы представляют собой частицы с билипидной мембраной размером 30–1000 нм (включая экзосомы), переносящие белки, липиды, mRNA и microRNA [23]. Каждый из этих компонентов может участвовать в защите от облучения при попадании в КМ. Интересно, что восстановление тромбоцитов в этом случае происходит в значительно меньшие временные рамки, чем при действии МСК. Дополнительные исследования необходимы, чтобы определить точный механизм, посредством которого микрочастицы осуществляют защиту от облучения.

Обсуждение

Нами предоставлены доказательства, что МСК не восстанавливают систему кроветворения, но способствуют спасению сохранившихся при облучении ГСК. Облучение вызывает чрезмерный воспалительный ответ [22], приводящий к гибели ГСК, если меры не приняты. Среди других органов наибольшему повреждению после облучения подвержены

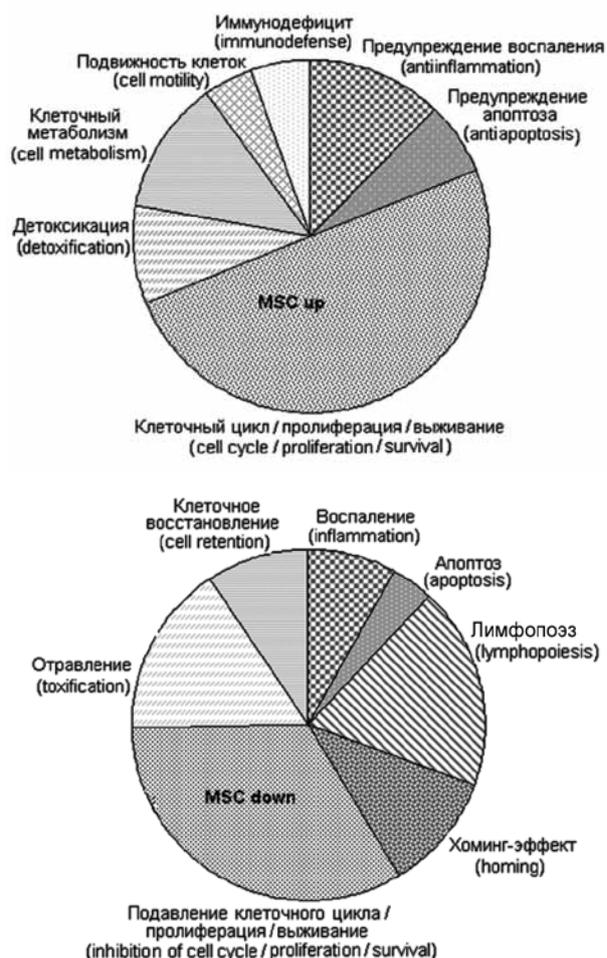


Рис. 7. Трансплантация МСК летально облученным животным изменяет экспрессию генов КМ. Данные по экспрессии генов получены анализом микрочипов, значительно измененные гены сформированы в кластеры. Экспрессия отображенных функциональных групп генов или увеличивается (MSC up, верх), или уменьшается (MSC down, низ) у животных с МСК-трансплантацией.

Fig. 7. MSC transplantation into lethally irradiated animals changes the gene expression in the bone marrow. Gene expression data were generated using microarray analysis and significantly regulated genes clustered into functional groups. Shown are functional gene groups upregulated (MSC up) or downregulated (MSC down) in MSC-transplanted animals.

whereas genes with supposed radiation-related BM deterioration were downregulated (Fig. 7).

Potential paracrine mechanism of MSC. The questions how MSC, which were trapped in the lung, transfer their protective effects to the BM remains an open question. Recently, we could show that injection of MSC-derived microvesicles resulted in a similar protection as MSC transplantation (Fig. 8). Microvesicles are ultra-small bilipidlayer particles of 30–1000 nm (including exosomes) known to shuttle proteins, lipids, mRNA and microRNA [23]. Each of the

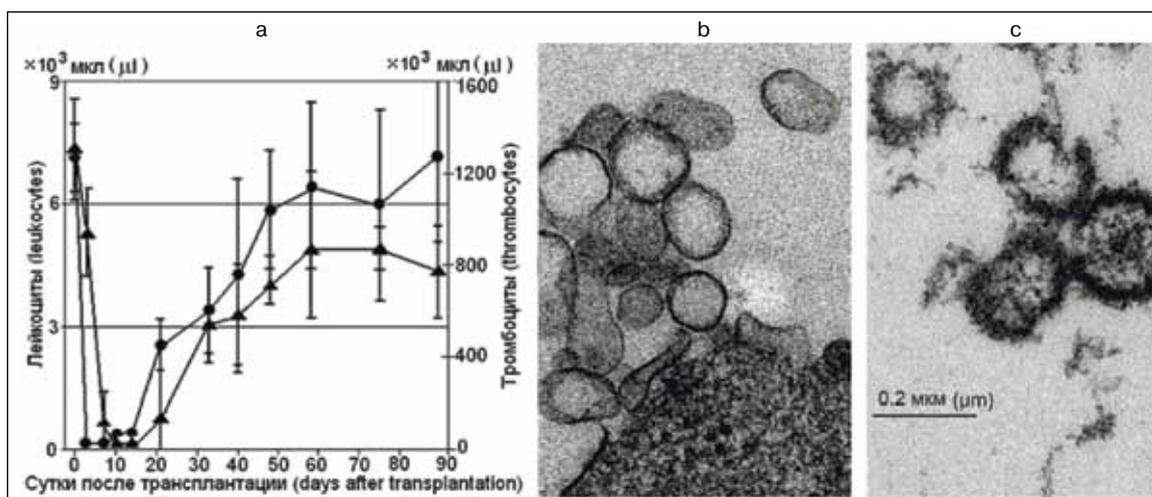


Рис. 8. Трансплантация микровезикул, секретлируемых МСК, спасает летально облученных животных. Количество лейкоцитов после инъекции микровезикул нормализуется с кинетикой, сравнимой с введением МСК, в то время как нормализация тромбоцитов происходит значительно быстрее (а) ($n = 15$). Электронная микроскопия микровезикул, высвобождаемых из мМСК (b) и очищенных ультрацентрифугированием (с).

Fig. 8. Transplantation of mMSC-derived microvesicles rescues lethally irradiated animals. Leukocyte counts after mMSC-derived microvesicle injection normalized with similar kinetics as with mMSC, whereas thrombocyte counts showed a much faster normalization (a) ($n = 15$). Electron microscopy of microvesicles released from mMSC (b) and purified by ultracentrifugation (c).

легкие, и они могут задерживать МСК. МСК вмешиваются в процесс воспаления путем изменения экспрессии генов не только в легких [18], но и в КМ. Для того, чтобы глобально изменить профиль экспрессии генов, у МСК нет необходимости в хоуминге в КМ.

Подобный механизм был описан при действии МСК при инфаркте миокарда [18]. Подобно мышинным МСК, МСК человека также накапливаются в легких и изменяют экспрессию гена и продукцию антиапоптотического фактора TSG6, который повышает репарацию миокарда без приживления МСК. Независимый от дифференцировки паракринный эффект МСК также снижает степень повреждения почек [16, 24]. Что мы ожидаем от МСК в качестве терапевтических агентов? На сегодняшний день принято считать, что секреция широкого спектра биологически активных молекул является основным механизмом, посредством которого МСК реализуют терапевтический эффект [4]. МСК секретируют биологические молекулы, которые: а) ингибируют апоптоз и ограничивают распространение повреждений; б) ингибируют фиброз и рубцевание в месте повреждения; в) защищают систему микрокапилляров; г) стимулируют ангиогенез для улучшения перфузии и пролиферацию тканеспецифичных клеток-предшественниц, что было показано для стволовых клеток в сердце, нервной ткани и почках [24, 25]. Параллельно мы показали, что при остром лучевом синдро-

components could participate in the radiation protection when transferred to the bone marrow. Interestingly, the reconstitution of platelets occurred at a faster time frame compared to MSC. Further work has to reveal the precise mechanism how microvesicles confer the radiation protection.

Discussion

We provide evidence that donor MSC do not reconstitute the hematopoietic system but salvage endogenous irradiation-surviving HSC. Irradiation produces excessive inflammatory responses [22], contributing to HSC death if untreated. Among other organs, the lung is heavily involved in irradiation damage and might retard MSC. MSC interfere with inflammation by changing the expression profile not only in the lungs where they dock [18] but also in BM. To do so, MSC not necessarily need to home to BM but might globally change gene expression. These mechanisms have been described for MSC influencing myocardial infarction [18]. Similarly to mMSC, injected hMSC trapped in lungs and changed gene expression producing antiapoptotic TSG6 which enhances myocardial repair without significant engraftment. Differentiation-independent paracrine MSC-effect also ameliorate kidney injury [16, 24].

What we have to expect from MSC as a therapeutic tool? Secretion of a broad range of bioactive molecules is now believed to be the main mechanism by which MSC achieve their therapeutic

ме МСК усиливают противовоспалительный, антиапоптотический, антиоксидативный ответ, положительно влияют на процессы детоксикации, клеточного цикла, в то время как провоспалительные процессы, формирование внеклеточного матрикса и адгезивные свойства подавлялись. В целом, системное ослабление вредных эффектов, вызванных миелосупрессией, является результатом введения МСК [16].

Заключение

Таким образом, МСК могут передавать свои врожденные трофические свойства в неортодоксальные зоны [2]. Наши результаты показали, что наличие секретируемых МСК микровезикул достаточно для радиопротективного действия. Наши результаты также предоставляют доказательства высокоэффективного паракринного механизма действия МСК, в частности в КМ, предполагающего, что инфузия МСК или просто микровезикул может быть эффективной и незамедлительной мерой при лечении радиационного поражения.

Несмотря на существующие ограничения в наших знаниях, возможности МСК/микровезикул проявлять терапевтический эффект через механизм свидетеля также могут указывать, что приживление в месте повреждения не является обязательной предпосылкой для защитного и лечебного эффекта на поврежденные ткани и, возможно, на тканеспецифичные стволовые клетки в условиях сильного стресса. Важно, что очень короткое время пребывания МСК в почках и/или целом организме может быть критическим фактором безопасности клеточной терапии.

effect [4]. MSC secrete bioactive molecules that (a) inhibit apoptosis and limit the extent of damage or injury; (b) inhibit fibrosis or scarring at sites of injury; (c) protect the microvasculature and stimulate angiogenesis to improve perfusion; and (d) stimulate the mitogenesis of tissue-intrinsic progenitor cells, as has been shown for cardiac-, neural- and kidney-specific stem cells [24, 25]. In parallel, in ARS we showed that MSC boosted anti-inflammation, anti-apoptosis, detoxification, cell cycle and anti-oxidative stress control whereas proinflammatory, ECM formation and adhesion properties were decreased. In general, systemic improvements counteracting deleterious effects of myelosuppression are the result of MSC injection [16].

Thus, transplanted MSC might export their inherent trophic effect to unorthodox sites [2]. Our recent results showed that MSC-secreted microvesicles were sufficient to transfer the protective effect. Our results present another piece of evidence for this highly effective paracrine mechanism working e.g. in BM, suggesting MSC- or even microvesicle infusion as efficient and immediate treatment option after irradiation injuries. Despite the limitations in our existing knowledge, the capacity of MSC/microvesicles to exert their therapeutic effect through bystander mechanisms also might indicate that persistent engraftment at the site of damage is not a mandatory prerequisite for having a protective and curative effect on injured tissues, and possibly on local progenitors during acute stress conditions. Importantly, the very brief residence time of MSC in the injured tissue and/or the entire organism might critically contribute to the safety of this cell-based therapy.

Литература (References)

1. Anderson D.J., Gage F.H., Weissman I.L. Can stem cells cross lineage boundaries? // *Nature Med.* 2001. Vol. 7, N 4. Pp. 393–395.
2. Caplan A.I., Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators // *J. Cell. Biochem.* 2006. Vol. 98, N 5. Pp. 1076–1084.
3. Chao N.J. Accidental or intentional exposure to ionizing radiation: biodosimetry and treatment options // *Exp. Hematol.* 2007. Vol. 35, Suppl. 4. Pp. 24–27.
4. Da Silva Meirelles L, Fontes A.M., Covas D.T., Caplan A.I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009. Vol. 20, N 5/6. Pp. 419–427.
5. Dominici M. [et al.]. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* 2006. Vol. 8, N 4. Pp. 315–317.
6. Ferrara J.L.M., Levy R., Chao N.J. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 1999. Vol. 5, N 6. Pp. 347–356.
7. Flidner T.M., Chao N.J., Bader J.L. [et al.]. Stem cells, multiorgan failure in radiation emergency medical preparedness: a U.S. // *European Consultation Workshop. Stem. Cells.* 2009. Vol. 27, N 5. Pp. 1205–1211.
8. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V. [et al.]. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo // *Transplantation.* 1974. Vol. 17, N 4. Pp. 331–340.
9. Graf T., Enver T. Forcing cells to change lineages // *Nature.* 2009. Vol. 462, N 7273. Pp. 587–594.

10. Hayashi T., Morishita Y., Kubo Y. [et al.]. Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors // *Am. J. Med.* 2005. Vol. 118, N 1. Pp. 83–86.
11. Hérodin F., Drouet M. Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches // *Exp. Hematol.* 2005. Vol. 33, N 10. Pp. 1071–1080.
12. Koç O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. [et al.]. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy // *J. Clin. Oncol.* 2000. Vol. 18, N 2. Pp. 307–316.
13. Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I. [et al.]. Multi-organ, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell // *Cell.* 2001. Vol. 105, N 3. Pp. 369–377.
14. Lange C., Schroeder J., Lioznov M.V, Zander A.R. High-potential human mesenchymal stem cells // *Stem Cells Dev.* 2005. Vol. 14, N 1. Pp. 70–80.
15. Lange C., Tögel F., Ittrich H. [et al.]. Administered mesenchymal stem cells are renoprotective in ischemia/reperfusion acute renal failures in rats // *Kidney Int.* 2005. Vol. 68, N 4. Pp. 1613–1617.
16. Lange C., Brunswig-Spickenheier B., Cappallo-Obermann H. [et al.]. Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, N 1. e14486.
17. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. [et al.]. Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study // *Lancet.* 2008. Vol. 371, N 9624. Pp. 1579–1586.
18. Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J. [et al.]. Intravenous hMSC improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 // *Cell Stem Cell.* 2009. Vol. 5, N 1. Pp. 54–63.
19. Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y. [et al.]. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow // *J. Exp. Med.* 2009, N 11. Vol. 206. Pp. 2483–2496.
20. Nauta A.J., Fibbe W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells // *Blood.* 2007. Vol. 110, N 10. Pp. 3499–3506.
21. Phinney D.G., Prockop D.J. Concise review: mesenchymal stem / multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair current views // *Stem Cells.* 2007. Vol. 25, N 11. Pp. 2896–2902.
22. Remberger M., Sundberg B. Cytokine production during myeloablative and reduced intensity therapy before allogeneic stem cell transplantation // *Haematologica.* 2004. Vol. 89, N 6. Pp. 710–716.
23. Théry C., Ostrowski M., Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. Vol. 9, N 8. Pp. 581–593.
24. Tögel F., Hu Z., Weiss K. [et al.]. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005. Vol. 289. F31–F42.
25. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. Vol. 8, N 9. Pp. 726–736.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (Германия, грант № 13N8904) и фонда «Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V.» (грант № DJCLS R 12/30). Благодарности за вклад в исследование выражаются Bärbel Brunswig-Spickenheier, Heike Cappallo-Obermann, Andrej-Nikolai Spiess, Rudolph Reimer и Jozef Zustin.

Acknowledgements. This work was supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany, grant number 13N8904 and by the “Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V.”, grant number DJCLS R 12/30. Bärbel Brunswig-Spickenheier, Heike Cappallo-Obermann, Andrej-Nikolai Spiess, Rudolph Reimer and Jozef Zustin were acknowledged for participation in the work.

Conflict of interests: There are no commercial associations that might create a conflict of interest in connection with this article.

Received 23.09.2014