

**SUMMARY**

**INCREASED IgE-ANTIBODIES TO STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXINS, HELMINTHES AND FUNGI IN PATIENTS WITH COPD AGAINST THE BACKGROUND OF CHRONIC NON-CALCULOUS CHOLECYSTITIS**

*Nazarenko A. P.*

Clinic of Immunology and Allergology "Forpost"

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

The article presents data about changes in clinical immunological data in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) accompanied by chronic noncalculous cholecystitis, specifically determination of total and specific IgE. Increased levels of IgE in patients with COPD are related to IgE to Staphylococcus aureus

enterotoxins, helminthes and fungi and mostly absent to respiratory allergens. Increased levels of Eosinophil Cationic Protein (ECP) in patients with COPD is determined only in patients with COPD that have specific IgE to Staphylococcus aureus enterotoxins and helminthes, and it correlates with clinical manifestations of COPD accompanied by chronic non-calculous cholecystitis. Combination COPD with pathology of the gall bladder significantly enhances and complicates their courses, which leads to a more significant disturbance in the cellular and humoral components of the immune system and makes a significant contribution to the formation of the syndrome of mutual aggravation.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease, chronic noncalculous cholecystitis, specific IgE

УДК 612.017.1:591.81:591.3:611-018.26:616-092.9

**ІМУНОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АДГЕЗИВНИХ КЛІТИН СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЇ ФРАКЦІЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ**

*ЛІСЯНИЙ М.І., СТАНЕЦЬКА Д.М.*

ДУ «Інститут нейрохірургії НАМНУ», відділ нейроімунології

Однією з ознак мезенхімальних стовбурових клітин є їх здатність до адгезії на пластику, що є основним методичним прийомом для їх отримання із різних тканин та органів [1,2,7,8]. В той же час немає єдиного протоколу виділення мезенхімальних стовбурових клітин та їх попередників. На сьогодні існує велика кількість різних літературних даних щодо використання різних термінів адгезії, від однієї години до 3-4 діб, для отримання фракцій клітин із яких, при подальшому культивуванні, легше одержати стовбурові мезенхімальні клітини [7-9]. З іншої сторони відомо, що деякі імунокомпетентні клітини, а саме макрофаги, моноцити, дендритні клітини та певні фракції лімфоцитів являються високоадгезивними до пластику [3,4]. Ця їх властивість досить часто використовується у різних імунологічних дослідженнях при отриманні збагачених фракцій як макрофагами, так і стовбуровими клітинами для вивчення їх імунних функцій, таких як цитотоксичність та фагоцитарна активність, здатність до синтезу цитокінів, антигенпрезентації тощо [9-12].

Для отримання адгезивних клітин використовують найчастіше кістковий мозок та жирову тканину дорослих тварин та людей, з яких можна отримати стовбурові клітини, для клітинної терапії та трансплантації [1,2,7,13,14].

У той же час практично не досліджено морфологічний склад різних типів адгезивних до пластику клітин жирової тканини, вплив адгезивних імунних клітин на інші фракції клітин. Не відомо про вміст адгезивних імунних клітин у жировій

тканині, а саме тканинних макрофагів, дендритних клітин, лімфоцитів, які як відомо приймають активну участь у розвитку вродженого та набутого імунітету. Не досліджена можливість відділення адгезивних макрофагоподібних клітин з імунними властивостями від клітин попередників стовбурових мезенхімальних клітин.

Завданням нашої роботи було вивчення протягом перших 24 годин динаміки адгезії до пластику суспензії клітин, які були отримані з жирової тканини у експерименті на щурах, та дослідити деякі функціональні і морфологічні особливості цих клітин.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Дослідження проведено на 56 білих нелінійних щурах вагою 150-200 гр, які розводились у віварії Інституту нейрохірургії.

Отримання суспензії клітин із підшкірної жирової тканини проводили за однією із загальноприйнятих методик [5]. Щурів умертвляли медичним ефіром у закритому ексикаторі. Після чого проводили обробку шкіри на животі тварини 5% спиртовим розчином йоду та робили розріз шкіри. Проводилось видалення підшкірної жирової клітковини в стерильну чашку Петрі з середовищем 199. Отриману жирову тканину подрібнювали ножицями та інкубували 1 годину в розчині 0,1% колагенази 1 типу. Потім проводили фільтрацію отриманої суспензії через капроновий фільтр та відмивали середовищем 199 від колагенази. Отриману суспензію клітин підраховували звичайним гематологічним методом у камері

Горяєва у 3% оцтовій кислоті та визначали життєздатність клітин 0,1% трипановим синім.

Адгезивну здатність суспензії клітин жирової тканини вивчали шляхом адгезії на пластикових чашках діаметром 3,0 см в поживному середовищі 199 з 5% ембріональною телячою сироваткою. Адгезію клітин проводили 1, 3 та 24 години. Після 1 години інкубації, клітини, які не прилипли до чашки, шляхом струшування переносили в іншу чисту чашку і залишали на 3 години інкубації. Після 3-ох годин інкубації, клітини, які не прилипли знову струшували в іншу чисту чашку і залишали для адгезії на 24 години інкубації. Паралельно з такою поетапною трьохступеневою адгезією клітин, проводили безперервну адгезію на протязі 24 годин. Для адгезії в усіх варіантах досліду на чашки Петрі вносили однакову кількість клітин, яка становила  $5 \times 10^6$  клітин в мл.

Інкубацію клітин на чашках Петрі проводили в CO<sub>2</sub> термостаті з 5% CO<sub>2</sub> та 95% повітря. Поживним середовищем було середовище 199 з ембріональною телячою сироваткою.

Після завершення 1-, 3- та 24-годинної інкубації адсорбовані клітини знімали розчином трипсину і ЕДТА, відмивали шляхом центрифугування та підраховували їх кількість за допомогою 3% оцтової кислоти.

Мієлопероксидазну активність визначали за методом М.З. Саїдова і Б.В. Пінегіна на імуноферментному аналізаторі. Кількість клітин для дослідження використовували в дозі  $1 \times 10^6$  клітин в 0,1 мл [6].

Морфологічний склад клітин проводили після фарбування мазків фарбою Романовського, які були приготовлені з адсорбованих клітин. Морфологічну будову клітин порівнювали з клітинами із гематологічного атласу [7].

Статистичну обробку результатів проводили на персональному комп'ютері за допомогою пакета програм Statistica 6.0 із застосуванням параметричних (тест Ст'юдента) і непараметричних критеріїв (Уїлкоксона), достовірною вважали різницю при  $p < 0,05$ .

### **РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ**

У таблиці 1. представлені порівняльні дослідження поетапної трьохступеневої адгезивної здатності клітин (1, 3, 24 години) та безперервної адгезії протягом 24 годин, одних і тих же зразків жирової тканини. Так за 24 години до 76,3% клітин нанесених на чашку Петрі адгезуються, тоді як за 1 годину адгезуються лише 21,4% клітин, а за наступні три години, ще 15,2% клітин. Тобто за 1 годину адгезії виділяється фракція клітин, яка складає лише 1/3 частину від загальної кількості клітин. Тоді як за 3 години лише 15% клітин адгезуються. Остання фракція (24 години) адгезованих клітин складає лише 28,6%, що в 2,5 рази менше

ніж при безперервній адгезії. Таким чином, вдалось розділити адгезивні клітини жирової тканини на 3 різні фракції, швидкоадгезивні, які як ми передбачаємо є макрофагально-дендритними клітинами, для яких характерні високоадгезивні властивості. Інші 2 фракції є повільноадгезивні клітини, які при культивуванні можуть дати мезинхімальні стовбурові клітини.

Вивчення морфологічного складу отриманих фракцій клітин було досить складним з-за причини різної структури та будови цих клітин. Всі клітини були розділені на 4 групи – це лімфоцитоподібні клітини, невеликі за розміром до 10-12 мікрон, з великим ядром та малою оболонкою цитоплазми, які подібні до лімфоцитів крові. Другу групу клітин склали клітини з великою цитоплазмою та ядром, подібні до макрофагів, які є в біоптатах селезінки чи кісткового мозку, фото яких наведені в різних гематологічних довідниках [7]. Третю групу склали великі за розміром клітини в 3-5 разів більші, ніж еритроцити та лімфоцити, з пінистою цитоплазмою. 4 групу склали клітини, які складно було аналізувати із-за великих розмірів, невеликого або великого ядра. Можливо, це були жирові клітини з крапельками жиру в цитоплазмі. У результаті проведених досліджень (табл. 2) виявлено, що в загальній фракції клітин, які отримали після обробки колагеназою, міститься до 22% лімфоцитоподібних клітин та 14% макрофагоподібних клітин, що сумарно складає третину всіх отриманих клітин. У той же час після односторонньої адгезії кількість цих клітин зростає в 2 рази, так лімфоцитоподібні клітини склали 47,2%, а макрофагоподібні 20%. У інших фракціях (3- та 24- годинній) зберігається значно менше цих типів клітин, особливо в фракції при 24 годинній адгезії. У той же час при безперервній 24-годинній адгезії виявлено збагачену лімфоцитоподібну фракцію клітин, але не таку значну, як при односторонній інкубації.

Отже, отримані фракції клітин 1-, 3-, та 24-годинної поетапної адгезії відрізнялись між собою за будовою клітин, розмірами та чутливістю до фарби азур-еозин, це дозволяє вважати, що ці клітини мають не лише різну адгезивну властивість, а різну морфологічну будову. У той же час виявлено, що за 1 годину найбільше адгезується не макрофагів, а лімфоцитоподібних клітин, до яких можна віднести і лімфоцити або попередники інших клітин. Практично до 50% швидкоадгезивних клітин були лімфоцитоподібні. У інших фракціях клітин їх залишалось менше і вони складали лише 13% в останній фракції при 24- годинній адгезії.

Дослідження функціональної активності цих клітин в тесті визначення активності внутрішньоклітинної мієлопероксидази, яка є показником високої фагоцитарної та кіллерної здатності клітин імунної системи, а саме нейтрофілів і макрофагів. Було встановлено, що перша одностороння

фракція адгезивних клітин має незначне, невірогідне підвищення цієї активності в порівнянні з клітинами 3 годинної фракції, хоча по відношенню до 24 годинної фракції вона була практично

в 2 рази вище. Мієлопероксидазна активність фракції безперервної 24 годинної адгезії була також висока і рівнялась вихідній загальній фракції, щойно отриманій від тварин.

Таблиця 1.

**Адгезивні властивості клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини в залежності від терміну адгезії ( у % у відношенні до вихідної фракції клітин ), n=5**

| Показник | Час адгезії (в годинах) |            |           |                |
|----------|-------------------------|------------|-----------|----------------|
|          | 1                       | 3          | 24        | 24 безперервне |
| M±m      | 21,4±1,9*               | 15,02±0,9* | 28,6±1,4* | 76,3±2,8       |

Примітка: \* - відмінність вірогідна у порівнянні з групою 24 години безперервної адгезії (p<0,05)

Таблиця 2.

**Морфологічні характеристики швидко- та повільноадгезивних клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини ( у % ), n=5**

| Час адгезії         | Морфологічна характеристика клітин |                  |                |            |
|---------------------|------------------------------------|------------------|----------------|------------|
|                     | Лімфоцитоподібні                   | Макрофагоподібні | Великі піністі | Інші       |
| Вихідна фракція     | 21,3±0,57                          | 13,8±0,24        | 26,4±0,65      | 38±0,79    |
| 1 год.              | 47,2±1,9*#                         | 20,15±0,63*      | 17,65±0,53*#   | 14±0,26*#  |
| 3 год.              | 28±0,68*                           | 14±0,26          | 31±0,74*       | 24±0,63*   |
| 24 год.             | 13±0,23*                           | 8±0,18*          | 33±0,76*       | 46±1,5*    |
| 24 год. безперервне | 36,4±1,4*                          | 16,8±0,52*       | 22,5±0,64*     | 24,3±0,64* |

Примітка: \* - вірогідність різниці показників вирахована між показниками груп різної тривалості адгезії і відповідними показниками вихідної фракції (p<0,05); # - вірогідність різниці показників вирахована між показниками групи 1 год. адгезії і відповідними показниками групи 24 год. безперервного культивування.

Таблиця 3.

**Мієлопероксидазна активність адгезивних клітин, отриманих при різних термінах адгезії**

| Показник | Час адгезії (в годинах) |            |          |            |                |
|----------|-------------------------|------------|----------|------------|----------------|
|          | Вихідна фракція         | 1          | 3        | 24         | 24 безперервне |
| M±m      | 3,36±0,29               | 4,06±0,31* | 3,0±0,25 | 2,25±0,14* | 3,68±0,3       |

Примітка: \* - відмінність вірогідна у порівнянні з вихідною фракцією (p<0,05)

Таким чином, проведені дослідження показують, що в складі адгезивних тканин жирової тканини присутні клітини з різними властивостями та морфологією, які можна розділити і визначити їх функцію в подальших дослідженнях. Збагачені фракції швидкоадгезивних клітин, які виділяються при 1 годинній інкубації за морфологічним та функціональними ознаками, а саме за мієлопероксидазною активністю, можна віднести до клітин лімфоцитарно-макрофагального типу, які, можливо, приймають участь в імунних реакціях і, які можна в подальшому використовувати для різних цілей, у тому числі для отримання аутологічних протипухлинних клітин на основі дендритних клітин. У той же час встанов-

лено, що при одноденній адгезії на пластику залишається дуже велика частина лімфоцитоподібних маленьких за розмірами клітин, тоді як макрофагоподібних клітин було мало.

Велику кількість швидкоадгезивних лімфоцитоподібних клітин можна пояснити тим, що поперше це можуть бути як тканинні лімфоїдні клітини, так і попередники макрофагоподібних клітин, чи мезенхімальних клітин, по-друге можливо фракції тканинних лімфоцитів мають певні відмінності від лімфоцитів крові. Подальше дослідження цих швидко та повільноадгезивних клітин жирової тканини являються важливими та перспективними як в плані трансплантаційного використання, так і в наукових та клінічних дослідженнях.

## ВИСНОВКИ

1. Суспензія клітин жирової тканини містить в собі швидко та повільноадгезивні клітини, котрі можна розділити шляхом різнотермінової адгезії на пластикових чашках Петрі. Швидкоадгезивна фракція, яка фіксувалась на пластику за 1 годину складала до 30% клітин від усієї популяції адгезивних клітин.
2. За морфологічним складом швидко та повільноадгезивні клітини відрізняються між собою, перші містять до 40% лімфоцитоподібних та до 25% макрофагоподібних клітин, тоді як в інших фракціях таких клітин не більше 8-15%, що свідчить про спорідненість швидкоадгезивних клітин з клітинами імунної системи організму.
3. Швидко та повільноадгезивні фракції клітин також відрізняються між собою за активністю внутрішньоклітинної мієлопероксидази, котра вірогідно вища в клітин швидкоадгезивної фракції.
4. Використання різнотермінової адгезії суспензії клітин жирової тканини дозволяє розділити ці клітини на різні фракції імунних та стромальних клітин, що дозволяє використовувати для вивчення їх імунологічних та інших властивостей.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Лисяний Н.И.* Иммуносупрессивные и антигенные свойства мезенхимальных стволовых клеток // Имунологія та алергологія. Наука і практика. 2012. № 4. — С. 4-8.
2. *Лисяний Н.И.* Мезенхимальные стволовые клетки и канцерогенез // Онкология. 2013. №1. — С. 4-8.
3. *Дерфлинг П.* Культивирование макрофагов и моноцитов // В кн.: Имунологические методы. 1984. С. 366-373.
4. *Дреслер Д.* Реакция торможения адгезии лейкоцитов // В кн.: Имунологические методы. 1984. С. 321-327.
5. *Петренко Ю.А., Мазур С.П., Грищук В.П.* Выбор условий индукции дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека в инсулинпродуцирующие клетки in vitro // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. — Т. 6, № 1. — С. 73-79.
6. *Саидов М.З., Пинегин Б.П.* Спектрофотометрический способ определения активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках // Лаб дело. — 1991, №3. — С.56-60.
7. *Козинец Г.И., Сарычаева Т.Г., Луговская С.А.* и др. Гематологический атлас: настоль-

ное руководство врача-лаборанта. — М.: Практическая медицина, 2008. — 187 с.

8. *Si Y.L.* MSC: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns / Y.L.Si, Y.L.Zhao, H.J.Hao [et al.] // Ageing Res Rev. — 2011. — Vol.10. — P.93-103.
9. *Parekkadan B.* Mesenchymal stem cells as therapeutics / B.Parekkadan, J.M. Milwid // Annu Rev Biomed Eng. — 2010. — Vol.12. — P.87-117.
10. *García-Gómez I.* Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications / L.García-Gómez, G.Elvira, A.G.Zapata [et al.] // Expert Opin Biol Ther. — 2010. — Vol.10. — P.1453-1468.
11. *Ra J.* Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells / J.Ra, S.Kang, S.Shin [et al.] // J. Transl Med. — 2011. — Vol.9. — P.181, Published online 2011 October 21.
12. *Ra J.C.* Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans / J.C. Ra, I.S. Shin, S.H.Kim [et al.] // Stem Cells Dev. — 2011. — Vol.20. — №8. — P.1295-1296.
13. *Pittenger M.F.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F.Pittenger, A.M.Mackay, S.C.Beck [et al.] // Science. — 1999. — Vol.284. — P.143-147.
14. *Nauta A.J.* Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells / A.J.Nauta, W.E.Fibbe // Blood. — 2007. — Vol.110. — P.3499-3506.
15. *Yañez R.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease / R.Yañez, M.L.Lamana, J.García-Castro [et al.] // Stem Cells. — 2006. — Vol.24. — P.2582-2591.
16. *Le Blanc K.* Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience / K.Le Blanc, O.Ringden // J. Intern Med. — 2007. — Vol.262. — P.509-525.

## РЕЗЮМЕ

### ІМУНОЛОГІЧЕСЬКІ СВОЙСТВА АДГЕЗИВНИХ КЛІТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЇ ФРАКЦІЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИ

*Лисяний Н.И., Станецька Д.Н.*

ГУ «Інститут нейрохірургії ім. Акад. А.П. Ромоданова НАМН України»

Отдел нейроиммунологии

В статье исследованы адгезивные свойства клеток подкожной жировой ткани крыс, полученной путем ферментативной обработки 0,1% раствором коллагеназы в течение одного часа.

Установлено, що клетки стромально-васкулярної фракції жирової тканини мають різну адгезивну здатність до пластику на чашці Петри, виділяється швидкоадгезивна фракція, яка становить до 30% від всіх адгезивних клітин, і адгезується в течение 1,0 години, а також повільноадгезивна фракція, яка адгезується в течение 24 годин і становить більше 40%.

Швидкоадгезивні клітини за морфологічним складом подібні лімфоїдним і моноцитарно-макрофагальним клітинам і мають високу мієлопероксидазну активність, що дозволяє допускати наявність в них імунних цитотоксических властивостей. Таким чином шляхом різнострокової адгезії можна отримати різні за морфологічними і функціональними властивостями клітини.

## SUMMARY

### IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF ADHESIVE CELLS STROMAL-VASCULAR FRACTION OF ADIPOSE TISSUE

*Lisiany N.I., Stanetska D.N.*

Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov of national Academy of Science of Ukraine

In the article adhesive properties of cells of subcutaneous adipose tissue of rats, obtained by enzymatic treatment 0.1% collagenase solution within one hour.

Found that stromal-vascular cells fraction of adipose tissue have different adhesive ability on plastic petri dish, appeared fastadhesive fraction, which is 30% of total adhesion of cells that adhesion for 1.0 h and slowlyadhesive fraction adhesion within 24 hours and is over 40%.

Fast adhesive fraction cells on morphological structure similar lymphoid and monocyte-macrophage cells and have high myeloperoxidase activity that can prevent the presence of immune cytotoxic properties. Thus by varying lengths of adhesion can get different morphological and functional properties of the cell.

УДК: 616-056.3-076-08-035:615.218.2

## СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА И КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ПОЛИНОЗОМ С СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ К ПЫЛЬЦЕ АМБРОЗИИ НА ФОНЕ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА И НАРУШЕНИЯ ПИЩЕВОГО СТАТУСА

*КУЗНЕЦОВ О.Г.*

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л.Шупика

**Вступление.** Питание является одним из самых существенных факторов внешней среды, которая влияет на функциональное состояние всех органов и систем, определяет состояние адаптационных возможностей организма, способствует здоровью или наоборот вызывает развитие заболеваний, способствует их хронизации и прогрессу. Функциональное состояние органов и систем больных полинозом с сенсibilизацией к пыльце амброзии (П с СПА) определяется резервами энергетического, пластического и регуляторного обеспечения, которые клетки получают с продуктами питания [1, 2, 10].

Течение П с СПА зависит от способности организма адекватно реагировать на повреждающие факторы, такие как инфекция, техногенные, информационные, психоэмоциональные и другие нагрузки. П с СПА характеризуется дисфункцией нервной, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем, коррекция которых требует адекватного обеспечения

организма больных всеми необходимыми макро- и микронутриентами [1, 12].

Длительное, а часто пожизненно необоснованное ограничение части ценных пищевых продуктов у больных П с СПА без соответствующей коррекции питания может быть причиной у больных П с СПА углубление иммунных нарушений, в том числе способности слизистой оболочки дыхательных путей производить иммуноглобулины и другие факторы защиты от вирусов и бактерий, развитию астении, повышению массы тела и другим нежелательным метаболическим сдвигам [8, 11].

Неадекватное питание также является одной из причин вторичного иммунодефицита, который имеет негативное влияние на ход П с СПА [7, 9, 12].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было изучено 75 больных (в возрасте от 18 до 50 лет, 40 мужчин и 35 женщин) П с СПА с нарушениями легкой и средней степени тяжести патологического процесса с учетом нару-