

УДК 612.017.1: 612.64: 591.81: 616-092.9

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ АДГЕЗИВНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА*ЛИСЯНЫЙ Н.И., ЗАДОРЖНАЯ Е.В., ГНЕДКОВА И.А., БЕЛЬСКАЯ Л.Н.,
СТАНЕЦКАЯ Д.Н., КЛЮЧНИКОВА А.И.*

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины»

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), как известно, происходят с адгезивных фибробластноподобных клеток тканей организма, в том числе и костного мозга. Их рекомендуют к широкому использованию в различных разделах медицины, включая онкогематологию, неврологию, эндокринологию, кардиологию и т.д. Эти клетки обладают широким биологическим действием, среди которого необходимо отметить иммуномодулирующее действие на многие иммунные реакции, иммунные клетки, в частности, МСК вызывает торможение реакции трансплантат против хозяина при пересадке аллогенного мозга, угнетают аллергические и аутоиммунные реакции [1-5].

Механизм действия МСК и их предшественников во многом изучен и осуществляется как путем межклеточного взаимодействия, так и посредством продукции ими различных активных молекул типа оксида азота, индоламина, цитокинов, особенно, бета трансформирующего фактора роста [6-10]. В тоже время условия получения МСК из костного мозга достаточно сложны и требуют длительного культивирования и специальных питательных сред, что может составлять от 15-20 дней до нескольких месяцев. К настоящему времени протоколы, получение МСК не стандартизированы и неизвестно когда и как в процессе культивирования адгезивных клеток, полученных из костного мозга, происходит трансформация их в МСК и начинают синтезироваться и выделяться в окружающую среду биологические активные вещества, иммунорегуляторные факторы. Поэтому целью настоящей работы было изучение супернатантов клеточных культур адгезивных клеток костного мозга (т.е. кондиционной среды) на функциональную активность иммунных клеток в тестах *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение адгезивных клеток. Выделение костного мозга из бедренных косточек крыс проводили по описанным многими авторами стандартной методике [11]. Клетки костного мозга крыс, усыпленных медицинским эфиром, выделяли из бедренных косточек, из которых стерильной средой 199 вымывали клетки костного мозга. Полученные клетки фильтровали

через капроновый фильтр, отмывали средой 199 и после подсчета количества клеток в камере Горяева суспендировали в концентрации 5×10^6 клеток в 1 мл в питательной среде ДМЕМ +10% эмбриональной телячьей сыворотки +100 ед. гентамицина. Взвесь клеток переносили в пластиковые чашки Петри диаметром 30 мм и культивировали в CO_2 инкубаторе при 5% содержании CO_2 при $t-37^\circ\text{C}$. Через 24 часа от начала культивирования чашки легонько встряхивали и удаляли не прилипшие клетки вместе с питательной средой. На чашки Петри с адгезивными клетками вновь наносили 3,0 мл питательной среды и инкубировали в CO_2 инкубаторе. Каждые 3 дня производили отбор питательной среды по 1,5 мл и заменяли 1,5 мл новой среды. Каждые 2 дня контролировали с помощью инвертированного микроскопа состояние и рост адгезивных клеток в культуре, где отмечалось быстрое увеличение числа клеток, пересеивали на новые чашки Петри, предварительно смыв 0,5% раствором трипсина адгезивные клетки. Длительность культивирования составляла от 20 до 25 дней клеточных культур. Отбираемые из культур клеток супернатанты, собирали в 3 фракции: супернатанты ранних сроков культивирования до 7 дня (фракция 1), супернатанты средних сроков культивирования 8-16 день (фракция 2), супернатанты длительного культивирования 16 и более дней (фракция 3). Собранные супернатанты культур от разных серий опытов и сроков объединяли, расфасовывали по небольшим объемам до 3,0 мл и замораживали и хранили при $t-20^\circ\text{C}$. В опыты брали свежие размороженные супернатанты, с которыми работали 1-3 дня и которые хранили при $t-4-6^\circ\text{C}$. Выделение лимфоцитов из крови человека проводили на триомбратовом градиенте по стандартной методике [12]. Лейкоциты крови человека получали при 1,5 часовом отстаивании 3,0 мл крови. Выделенные иммунные клетки (лейкоциты или лимфоциты) в концентрации 5×10^6 клеток в 1 мл культивировали с супернатантами в соотношении 1:1 в объеме 200 мл в 96 луночных планшетах в полной питательной среде в течение часа.

Иммуномодулирующую активность супернатантов изучали в тестах *in vitro* в следующих реакциях: определение фагоцитарной

активності лимфоцитів с НСТ по методу [13], визначення мієлопероксидазної активності лейкоцитів [14], визначення активації лимфоцитів в тесті МТТ [15]. Крім цього проводили вивчення впливу фракцій на бласттрансформацію лимфоцитів цельної крові [16]. Отримані дані були оброблені з допомогою програм «Статистика» для ПК.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБСУЖДЕНИЕ

Проведеними дослідженнями встановлено, що супернатанти культур, адгезивних до пластику кліток кісткового мозку по-різному впливають на функціональну активність лейко-

цитів і лимфоцитів (табл. 1). Так, ранні супернатанти фракції №1 при 1-годинній інкубації з лейкоцитами практично не змінювали як мієлопероксидазну, так і НСТ активності лейкоцитів крові людини, тоді як фракції №2 і №3 викликали різнонаправлене вплив на ці клітки. НСТ активність лейкоцитів, інкубованих з фракцією №2 і №3 достовірно зростала, тоді як мієлопероксидазна активність цих же самих кліток від одних і тих же пацієнтів, знизалась. Особливо помітно була подавляюча активність фракції №3, де відмічено майже 2-кратне зниження ферментивної активності нейтрофілів.

Таблиця 1

Вплив супернатантів кліткових культур стромально-васкулярної фракції кліток кісткового мозку на мієлопероксидазну і НСТ активність лейкоцитів крові

Обозначение	Контрольные значения	Фракции супернатантов		
		Фракция №1 (до 7 дн.)	Фракция №2 (7-15 дня)	Фракция №3 (более 15 дней)
Уровень миелопероксидазной активности (y.e.) n=9 P=0	9,04±0,52	7,58±0,72 >0,05	6,30±1,14 >0,05	5,56±0,83 <0,05
НСТ активность (y.e.) n=19 P=0	0,235±0,006	0,244±0,011 >0,05	0,280±0,008 <0,05	0,265±0,014 <0,05

Следовательно, можно утверждать, что адгезивные клетки, начиная с 7-8 дня, синтезируют факторы, способные изменить функциональную активність нейтрофілів, що, в общем, согласуется с данными о широком спектре иммунорегуляторных факторов, вырабатываемых МСК. Изучая влияние супернатантов культур адгезивных клеток на культуру лимфоцитов в тесте пролиферации с ФГА выявлено

(табл.2), что инкубация их с цельной кровью, без ФГА, в течение 48 часов не изменяла спонтанной активации лимфоцитов как в исходной культуре, так и в культуре клеток крови с фракциями, процент бласттрансформации лимфоцитов был примерно одинаковым - от 4,7±1,2 до 6,8±1,52%, т.е. супернатанты разных сроков инкубации не изменяли самостоятельно активність клеток крови.

Таблиця 2

Вплив супернатантів культур адгезивних кліток кісткового мозку на проліферативну активність лимфоцитів в тесті РБТЛ (в %) (n=14)

		Контрольная проба	Фракции		
			1	2	3
Спонтанная пролиферация (без ФГА)	M+m P	5,93±0,72	6,46±1,22 >0,05	4,7±1,2 >0,05	6,86±1,52 >0,05
Индукцированная пролиферация (с ФГА)	M+m P	49,25±4,48	18,83±3,92 <0,05	25,45±5,35 <0,05	35,72±5,44 >0,05

В тоже время при совместном культивировании указанной фракции и ФГА было выявлено, что фракция №1 (ранние сроки культивирования) в 3 раза угнетает пролиферацию лимфоцитов в тесте РБТЛ с ФГА (p<0,01), не достовірно. Немного меньше угнетает фракция супернатан-

тов №2. Фракция №3 также вызывала снижение пролиферации лимфоцитов примерно на 10%, их различия между показателями не достовірно (p>0,06). Сравнивая действие фракции №1 и №3 можно также отметить, что фракция №1 подавляет пролиферацию лимфоцитов досто-

верно сильнее, чем фракция №3. Следовательно, во фракции супернатантов №1, полученной из 6-7 дневной культуре адгезивных клеток содержится фактор подавляющей пролиферацию лимфоцитов, синтез, которого постоянно снижается и уже адгезивных клеток культуры 15-17 суток культивирования, выделяют его в меньшем количестве, о чем свидетельствует слабая ингибиторная активность супернатантов поздних сроков культивирования.

Изучение иммунорегуляторной функции супернатантов в культуре выделенных лимфоцитов в МТТ тесте (табл.3) реактивом показало, что уже через 24 часа инкубации имеется тенденция к угнетению митохондриального дыхания культуры лимфоцитов и торможение их ак-

тивации на 9-30% по сравнению с контролем. Разница в ингибции активации лимфоцитов между отдельными фракциями через 24 часа инкубации не достоверная. В тоже время при 48 часовом культивировании установлено, что все супернатанты угнетают активацию лимфоцитов и наибольшее угнетение, до 80,2%, вызывает фракция №1 супернатантов, что достоверно выше, чем фракция №2 и №3. Проведенные исследования в МТТ тесте позволяют предполагать о возможном механизме действия этих супернатантов, который может быть связан с активностью ферментов митохондрий, так как МТТ тест отражает, согласно многочисленным ферментам, состояние дегидрогеназ в митохондриях [16].

Таблица 3

Угнетение супернатантов клеточных стремально-васкулярной фракция клеток костного мозга на МТТ активность лимфоцитов in vitro (%)

Время инкубации с лимфоцитами	Индекс подавления в %		
	Фракция №1 (до 7 дн.)	Фракция №2 (7-15 дней)	Фракция №3 (более 15 дней)
24 часа	19,1	32,1	9,6
48 часов	80,2*	60,7	58,9

*- $p < 0,05$ – достоверное различия с другими факторами

Обобщая проведенные исследования можно отметить, что адгезивные клетки костного мозга, являясь предшественниками МСК, в процессе длительного культивирования, выделяют иммунорегуляторные факторы, которые могут угнетать как функцию лимфоцитов, так и лейкоцитов в тестах in vitro. Установлено также, что супернатанты культур адгезивных клеток по-разному влияют на функциональную активность нейтрофилов и лимфоцитов. Так, супернатанты 6-7 дневных культур (фракция №1) практически не влияет на функцию нейтрофилов и лишь фракция №3 вызывает подавление миелопероксидазной активности нейтрофилов, тогда как действие фракции на лимфоциты совершенно иное, так фракция №1 обладает выраженной иммуносупрессивной активностью, а фракция №3 обладает слабой активностью. Все это позволяет предполагать, что имеет место действие не одного, а нескольких факторов, которые, находясь в разных концентрациях в исследованных фракциях, одни из них подавляют миелопероксидазную активность нейтрофилов, другие, наоборот, действуют больше на лимфоциты, вызывая торможение их активации [8-10].

Полученные результаты указывают на то, что известная иммуномодулирующая, в основном, иммуносупрессивная активность адгезивных клеток, меняется в процессе культивирования и превращающимися их в МСК, а также то, что влия-

ние на иммунные реакции указанные клетки осуществляют посредством синтеза гуморальных факторов, куда относятся как интерлейкин-10, трансформирующий фактор бета, индоламил амил и другие [6]. Установление факта синтеза различных по механизму действия факторов адгезивными клетками костного мозга, указывает на теоретическую возможность их применения для лечения различных иммунопатологических состояний, а именно аллергии, аутоиммунной патологии и реакций трансплантат против хозяина.

ВЫВОДЫ

1. При культивировании адгезивных к пластике клеток костного мозга выделяются в культуральную среду иммунорегуляторные факторы, активность которых зависит от сроков культивирования.
2. Супернатанты ранних сроков культивирования адгезивных клеток костного мозга (супернатанты 6-7 дня) обладают выраженным ингибирующим действием на пролиферацию лимфоцитов в тесте РБТЛ с ФГА, тогда как супернатанты поздних сроков слабо угнетают пролиферацию лимфоцитов.
3. Супернатанты поздних терминов культивирования клеток после (14-16 суток), культур, содержащих фибробластные мезенхимальные

стволовые клетки подавляют миелопероксидазную активность нейтрофилов, тогда как супернатанты ранних сроков не оказывают влияния на миелопероксидазную активность нейтрофилов.

- Получение очищенных иммунорегуляторных факторов, из культур адгезивных клеток костного мозга, обладающих различным действием на лимфоциты и нейтрофилы предполагает возможность их использования при коррекции иммунопатологических реакций.

ЛИТЕРАТУРА

- Si Y.L.*: 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.
- Parekkadan B.* Mesenchymal stem cells as therapeutics / B.Parekkadan, J.M. Milwid // *Annu Rev Biomed Eng.* – 2010. – Vol.12. – P.87–117.
- 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.
- 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.
- 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.
- Лісяний М.І.* Мезенхімальні стовбурові клітини та їх імунні властивості / М.І.Лісяний // *Фізіологічний журнал.*-2013.-№13.-С.126-132.
- Ren G.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide / G.Ren, L.Zhang, X.Zhao [et al.] // *Cell Stem Cell.* –2008. – Vol. 2.– P.141–150.
- Nasef A.* Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells / A.Nasef, A.Chapel, C.Mazurier [et al.] // *Gene Expr.* – 2007.– Vol. 13. – P.217–226.
- Di Nicola M.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli / M.Di Nicola, C.Carlo-Stella, M.Magni [et al.] // *Blood.* –2002. – Vol.99. –P.3838–3843.
- Aggarwal S.* Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S.Aggarwal, M.F.Pittenger // *Blood.* – 2005. – Vol.105. P. 1815–1822.
- Гумерова А.А.* Звездчатые клетки печени стимулируют дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы в гепатоциты in vitro / А.А.Гумерова, А.К.Шафигуллина, А.А.Трондин [и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* -2011.-Т.VI.-№4.-С.72-81.
- Фримель Г.* Иммунологические методы / Г.Фримель.-М., 1987.-
- Гордієнко С.М.* Визначення фагоцитарної активності (НСТ-тест) / С.М.Гордієнко // *Лабораторное дело.*-1983.-№2.-С.
- Саидов М.З.* Спектрофотометрический способ определения фагоцитарной активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках / М.З.Саидов, Б.П.Пинегин // *Лабораторное дело.*-1991.-№3.-С.56-60.
- Шпакова А.П.* МТТ-коллометрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток / А.П.Шпакова, И.С.Павлова // *Клиническая лабораторная диагностика.*-2000.-№3.-С.20-25.
- Лісяний Н.І.* Иммунологические свойства клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани / Н.І.Лісяний, И.А.Гнедкова, М.А.Гнедкова, А.А.Шмелева // *Імунологія та алергологія. Наука та практика.*-2013.-№1.-С.88-93.

РЕЗЮМЕ

ВИВЧЕННЯ ІМУНОМОДУЛЮЩИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АДГЕЗИВНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ

Лісяний М.І., Задорожна О.М., Гнідкова І.О., Бельська Л.М. Ключникова А.І.

ДУ «Інститут нейрохірургії Національної академії медичних наук»

У статті представлені дані з вивчення впливу супернатантів культур адгезивних клітин кісткового мозку щурів на активність імунних клітин in vitro. Встановлено, що їх імуномодулююча активність залежить від терміну культивування адгезивних клітин. Супернатанти ранніх термінів культивування до 7 діб гальмують активацію лімфоцитів в тесті бласттрансформації на ФГА та не впливають на фагоцитарну здатність нейтрофілів крові. Супернатанти довготривалого культивування (більше 16 діб) пригнічували міелопероксидазну активність лейкоцитів та невірогідно знижували проліферацію лімфоцитів в тесті бласттрансформації з ФГА.

Отримані дані свідчать, що при культивуванні адгезивні клітини кісткового мозку виділяють

різні імуноактивні чинники, які здатні пригнічувати активність лімфоцитів та нейтрофілів крові.

SUMMARY

STUDY OF IMMUNOMODULATORY PROPERTIES ADHESIVE CELLS OF BONE MARROW

Lisyaniy N.I., Zadorozhna E.N., Gnidkova I.A., Bel'ska L.N.,
Klyuchnikova A.I.

DU «Institute of neuro-surgery of the National academy of
medical sciences».

The article presents data on the effects of culture supernatants adhesive cells bone marrow of rats on the ac-

tivity of immune cells *in vitro*. Shown that their immunomodulatory activity depends on the date of the cultivation of adhesive cells. Supernatants of early cultivation to 7 days inhibit lymphocyte activation in the test blasttransformation to PHA and do not affect the phagocytic ability of neutrophils cells. Supernatants long-term cultivation (more than 16 days) backing, myeloperoxidase activity of leukocytes and improbable reduced proliferation of lymphocytes in the test blasttransformation to PHA.

These data suggest that the cultivation of adhesive bone marrow cells secrete various immune factors, with are able to suppress the activity of lymphocytes and neutrophils of blood.

УДК 616.5-002.2.:575

РОЗПОВСЮДЖЕНІСТЬ ПОЛІМОРФНОЇ АЛЕЛІ RS420297 С/Т ГЕНУ ГАЛЕКТИНУ-10 (CLC-10) ТА ЇЇ ЗВ'ЯЗОК З ОКРЕМИМИ ІМУНОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ СЕРЕД ХВОРИХ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ

САКЕВИЧ В.Д., ШЛИКОВА О.А., ІЗМАЙЛОВА О.В., КАЙДАШЕВ І.П.

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Вивчення генетичних основ atopії є актуальною проблемою сьогодення, необхідною для встановлення взаємозв'язку між спадковими та середовищними факторами в реалізації досить складного патологічного фенотипу та розумінню механізмів взаємодії полігенних систем в процесі реалізації спадкової інформації на рівні цілісного організму. Знаючи молекулярні та клітинні механізми формування захворювань, можливо намітити гени, білкові продукти яких є найбільш значущими [2,3,4].

За даними досліджень існують відомості щодо асоціації алергічного риніту із поліморфізмом гену TIM-1 [5], CD14 [6], TLR 2-4 [7], РНКазі 3[8].

Останнім часом з'явилися окремі повідомлення щодо можливої ролі в якості гена-кандидата білка кристалів Шарко-Лейдена (галектин-10)[9]. Галектин -10 (CLC-10) є представником родини ендогенних лектинів (відомий, як лізофосфоліпаза, білок Шарко - Лейдена), виявлений в еозинофілах та базофілах. За структурною організацією галектин-10 відноситься до галектинів «прототипу», що містить один вуглеводзв'язуючий домен, та утворює нековалентні димери. Існує три ізоформи галектину-10, які конституційно експресовані на T_{reg} клітинах (CD25⁺) і практично відсутні на спокійних та активованих CD4⁺ клі-

тинах. Дослідженнями доведена значна внутріклітинна експресія галектину -10 в CD25⁺ T_{reg} клітинах. Він безпосередньо не бере участі в пригніченні функції CD25⁺ T_{reg} клітин, однак специфічна блокада галектину -10 відновлює проліферативну здатність CD25⁺ T_{reg} клітин та підсилює їх супресивні функції. Отже галектин -10 є необхідним для здійснення регуляторної активності T_{reg} клітин [10].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Метою дослідження було визначення ролі поліморфізму rs420297 С/Т гену галектину-10 (CLC-10), в розвитку алергічного риніту визначення розповсюдженості поліморфних варіантів в групі спостереження і в групі популяційного контролю, аналізу імунологічних показників та клінічних проявів.

Для вирішення висунутих завдань проведено обстеження 45 хворих на АР віком від 19 до 65 років (35,6 ± 1,57) (чоловіки склали 51% (23 хворих), а жінки – 49 % (22 хворих)). На момент обстеження хворі знаходились в стадії клінічної ремісії та припиняли прийом протиалергічних препаратів за 72 години, хворі не мали важкої супутньої патології.

Діагноз АР встановлювали на основі критеріїв діагностики ARIA (2008) за алгоритмом діагностики прийнятим в Україні та затвердженим МОЗ