

УДК 619:57.085.23

**ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ ЛЕЙКОЦИТІВ І СИРОВАТКИ КРОВІ
ЩУРІВ ВІДНОСНО АЛОГЕННИХ КУЛЬТУР КЛІТИН КІСТКОВОГО
МОЗКУ ТА ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ**

В. В. КОВПАК, кандидат ветеринарних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: vitkovpak@mail.ru

***Анотація.** Досліджено цитотоксичну активність сироватки та лімфоцитів крові сенсibiliзованих тварин відносно культури клітин кісткового мозку та підшлункової залози. Встановлено, що лейкоцити крові контрольної та дослідної групи не проявляли цитотоксичного ефекту до зазначених культур клітин. Варто відмітити, що сироватка крові сенсibiliзованих тварин залишалася інтактною до культури клітин кісткового мозку й індекс проліферації відповідав контролю. У той самий час нами відмічено цитотоксичний вплив сироватки крові сенсibiliзованих тварин на культуру клітин підшлункової залози, який знижувався зі збільшенням пасажів, індекс проліферації за використання клітин I-го пасажу складав 0,73, IV -го пасажу – 0,94.*

***Ключові слова:** цитотоксичність, сироватка крові, лейкоцити, культура клітин кісткового мозку, культура клітин підшлункової залози*

Актуальність. Цукровий діабет – ендокринне захворювання, що характеризується синдромом хронічної гіперглікемії, є наслідком недостатньої продукції і/або дії інсуліну, що призводить до порушення всіх видів обміну речовин, насамперед вуглеводного, ураження судин (ангіопатії), нервової системи (нейропатії), а також інших органів і систем [**Ошибка! Неизвестный аргумент ключа., 5**]. Інтерес до вивчення цієї патології не згасає і спонукає науковців до пошуків нових шляхів діагностики і лікування цукрового діабету та його ускладнень. Незважаючи на вище сказане, основним методом терапії цукрового діабету першого типу все ще залишається використання інсуліну [1]. Варто зазначити, що інсулінотерапія загрожує розвитком інсулінорезистентності, появою алергічних реакцій та ліподистрофією. Крім

того, екзогенне введення інсуліну не в змозі попередити прогресування ускладнень цукрового діабету.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. У той же час клітинна терапія у лікуванні цукрового діабету – це альтернативний метод, оснований на використанні регенеративного потенціалу стовбурових клітин дорослого організму[9, 7, 4]. Це далеко не новий метод, більш ніж 30 років тому розпочалися експериментальні роботи щодо трансплантації β -клітин острівців Лангерганса[4]. Проте залишається ряд невирішених питань щодо впровадження клітинних технологій у практику. Одним із них є взаємодія організму з трансплантованим клітинним матеріалом. Саме тому ми дослідили цитотоксичну активність лейкоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенного клітинного матеріалу та порівняли вплив на клітини отримані з різних органів: кісткового мозку та підшлункової залози.

Мета дослідження – вивчити цитотоксичну активність лейкоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенних культур клітин кісткового мозку та підшлункової залози.

Матеріали і методи дослідження. Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року), «Загальних етичних принципів експериментів над тваринами», схвалених Національним конгресом з біоетики і узгоджених із положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). У досліді використали 15 нелінійних щуренят 12-добового віку, та 9 нелінійних самців щурів середньою масою 300 г. Тварини були розділені на три групи: I – контрольна, II – вводили культуру клітин кісткового мозку, III – культуру клітин підшлункової залози. Всі маніпуляції із тваринами виконувалися під загальним наркозом для чого одноразово внутрішньочеревно вводили 2%-й розчин тіопенталу-натрію з розрахунку 4 мг на 100г живої маси.

Для визначення цитотоксичної активності лімфоцитів крові на 15 добу після введення клітин, в 96-лункові плоскодонні планшети вносили 0,1 мл суспензії клітин у стандартному культуральному середовищі (80% середовища Ігла модифікованого Дюльбеко, 20 % фетальної сироватки телят із додаванням антибіотика-антимікотика у розрахунку 10 мкл/ 1 мл середовища) в концентрації 3×10^4 та ставили в CO₂-інкубатор із метою прикріплення клітин до дна культурального пластику. Через годину в лунки з клітинами мішенями вносили 0,1 мл лімфоцитів у концентрації 1×10^5 (співвідношення клітини-мішені : лімфоцити – 1:3) та інкубували в CO₂-інкубаторі протягом 18 годин за 5%-ого вмісті CO₂, 100 %-й вологості та t=37°C [3].

Цитотоксичну активність сироваток крові на 15 добу визначали за модифікованим співробітниками кафедри методом Г. В. Діденка [2]. Для отримання сироватки крові нестабілізовану кров відстоювали до повного згортання фібриногену, піпеткою відбирали сироватку та центрифугували протягом 5–7 хв за 300 g. Паралельно в 96-лункові плоскодонні планшети вносили 0,1 мл суспензії клітин у стандартному культуральному середовищі в концентрації 3×10^4 та додавали 10мкл сироватки дослідних тварин. Інкубували 40 хв за кімнатної температури. Після чого додавали 0,1 мкл комплементу (розведення 1: 4) та інкубували за стандартних умов 18 год. [7].

Після закінчення інкубації лунки тричі промивали фосфатно-буферним розчином для видалення неприкріплених клітин та лімфоцитів. В кожну лунку вносили по 100мкл 0,25%-ого р-ну трипсин-Версену (t=37°C) розпіпетовували відкріплені клітини та підраховували в камері Горяєва. Про наявність цитотоксичного ефекту відносно трансплантованих клітин свідчить відсутність їх проліферативної активності та зниження життєздатності [3].

Результати дослідження та їх обговорення. Аналіз результатів досліджень показав, що життєздатність та проліферативна активність алогенних культур клітин кісткового мозку та підшлункової залози у цитотоксичному тесті із сироваткою та лімфоцитами крові контрольної та дослідних груп тварин вірогідно відрізняється.

Як видно з таблиці 1, цитотоксичного впливу лейкоцитів та сироватки крові інтактних тварин на культуру клітин як кісткового мозку так і підшлункової залози не відмічали. Відсутність цитотоксичного впливу лейкоцитів і сироватки крові інтактних щурів на досліджувані культури клітин можна пояснити відсутністю попередньої сенсibilізації лімфоцитів тварин антигенними детермінантами досліджуваних клітин, а, отже, відсутністю у сироватці крові тварин контрольної групи специфічних антитіл до їх рецепторів.

1. Проліферативна активність ККМ і ККПЗ щурів під час вивчення цитотоксичної активності лімфоцитів та сироватки крові інтактних тварин

Група тварин	Пасаж	Показники	ККМ		ККПЗ	
			лейкоцити	сироватка	лейкоцити	сироватка
Інтактні тварини (контроль)	I-й	К-ть клітин після культивування	30,2 ± 0,0	30,1 ± 0,1	30,2 ± 0,1	30,2 ± 0,1
		Індекс проліферації	1,01 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,01 ± 0,01	1,01 ± 0,00
	IV-й	К-ть клітин після культивування	30,3 ± 0,1	30,3 ± 0,1	30,3 ± 0,2	30,3 ± 0,1
		Індекс проліферації	1,01 ± 0,00	1,01 ± 0,01	1,01 ± 0,00	1,01 ± 0,01
Сенсibilізовані тварини (дослід)	I-й	К-ть клітин після культивування	30,2 ± 0,1	30,2 ± 0,0	30,3 ± 0,2	21,9 ± 0,9***
		Індекс проліферації	1,01 ± 0,00	1,01 ± 0,00	1,01 ± 0,01	0,73 ± 0,03***
	IV-й	К-ть клітин після культивування	30,5 ± 0,2	30,5 ± 0,1	30,4 ± 0,1	28,1 ± 0,4**
		Індекс проліферації	1,02 ± 0,01	1,02 ± 0,00	1,02 ± 0,00	0,94 ± 0,02*

Примітка. * – P<0,05; ** – P< 0,01; *** – P< 0,001 (порівняно з контролем)

За співкультивування культури клітин кісткового мозку лімфоцитами (рис. 2) та сироваткою (рис. 4) сенсibilізованих тварин суттєвих відмінностей

між контролем та дослідними групами як на першому, так і на четвертому пасажі немає (табл. 2). Отримані дані свідчать про відсутність цитотоксичного впливу як сироватки, так і лейкоцитів крові сенсibilізованих щурів на культуру клітин кісткового мозку.

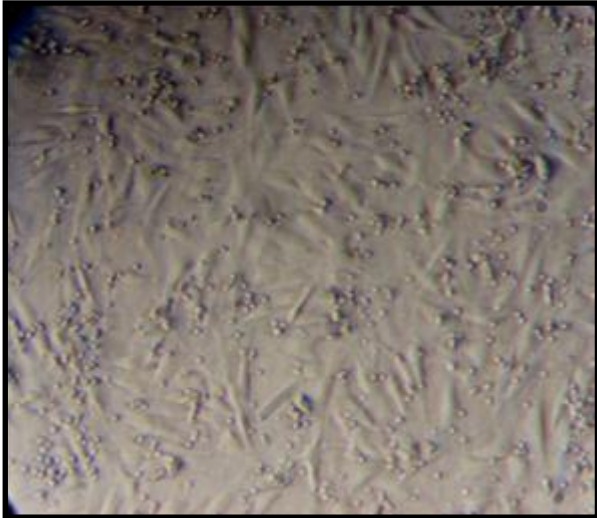


Рис.1. Нативний препарат. Субкультивування культури клітин підшлункової залози щура і лімфоцитів (4-й пасаж). Цитотоксичний ефект відсутній. 36.×320

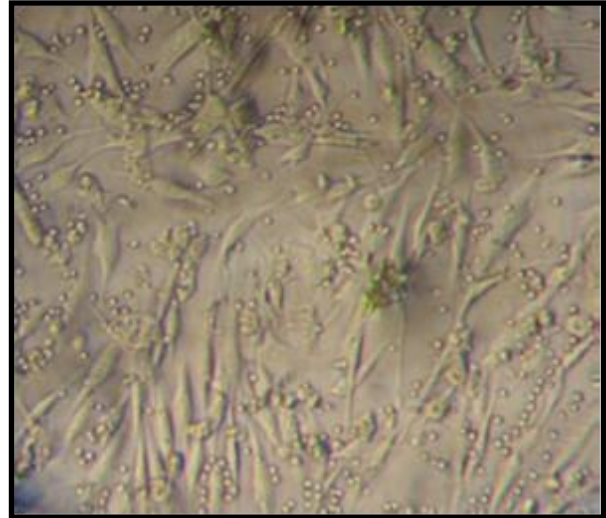


Рис.2. Нативний препарат. Субкультивування культури клітин кісткового мозку щура і лімфоцитів(4-й пасаж). Цитотоксичний ефект відсутній. 36.×320

Відсутність цитотоксичного впливу лейкоцитів крові сенсibilізованих тварин не відмічали і по відношенню до культури клітин підшлункової залози як першого так і четвертого пасажу, індекс проліферації становив 1,01 та 1,02 відповідно.

Відсутність цитотоксичної дії лімфоцитів на культури клітин може бути пов'язана з відсутністю розпізнавання НК-клітинами та цитотоксичними Т-клітинами [8] і супресивним впливом культур клітин на проліферацію та розвиток лімфоцитів [6].

Вивчення цитотоксичності сироватки на культуру клітин підшлункової залози показало достовірне зниження індексу проліферації. За використання в досліді культури клітин підшлункової залози першого пасажу відмічали зниження індексу проліферації до 0,73 (у порівнянні з контролем), візуально відмічали незначну кількість неприкріплених округлих клітин та зниження

щільності моношару. Під час використання клітин 4 пасажу у культуральному середовищі відмічали поодинокі неприкріплені клітини, візуально знижені щільності моношару не відмічали. Отримані дані свідчать про вибірково-цитотоксичний ефект сироватки крові сенсibilізованих тварин на культуру клітин підшлункової залози. Цитотоксичність сироватки на культуру клітин підшлункової залози із її подальшим зниженням із пасажами можна пояснити наявністю у культурі диференційованих клітин, кількість яких із пасажами знижується.

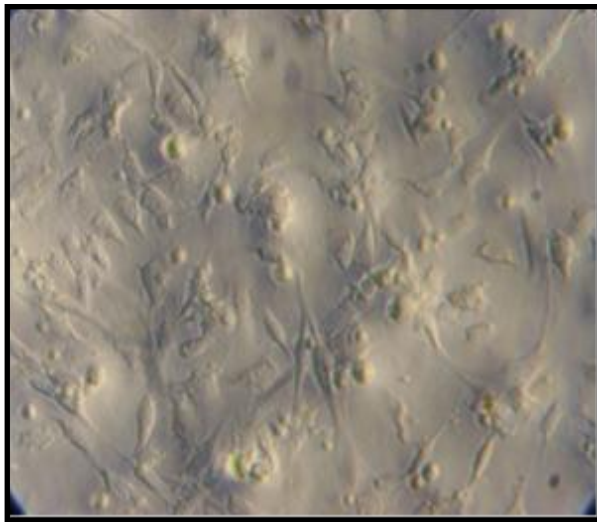


Рис.3. Нативний препарат. Культивування культури клітин підшлункової залози щура з додаванням сироватки сенсibilізованих тварин (4-пасаж). Слабо виражений цитотоксичний ефект. 36.×320

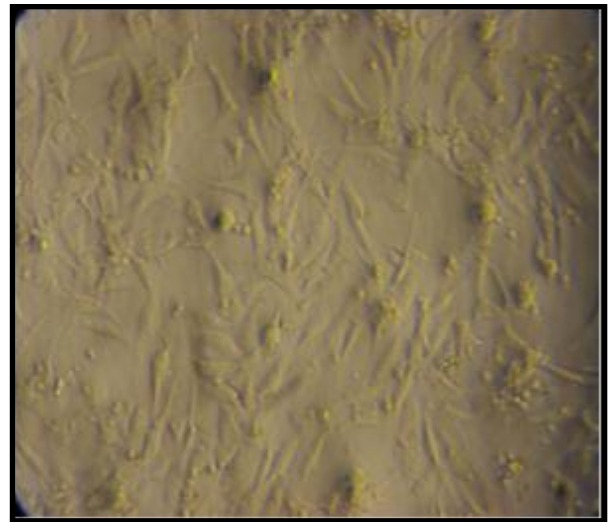


Рис.4. Нативний препарат. Культивування культури клітин кісткового мозку щура з додаванням сироватки сенсibilізованих тварин(4-пасаж). Цитотоксичний ефект відсутній. 36.×320

Вивчення цитотоксичності сироватки на культуру клітин підшлункової залози показало достовірне зниження індексу проліферації до 0,90. Візуально відмічали незначну кількість клітин, що не прикріпилися (рис.3). Отримані дані свідчать про вибірково-цитотоксичний ефект сироватки крові сенсibilізованих тварин на культуру клітин підшлункової залози, що може бути пояснено гетерогенністю культури з окремими більш диференційованими клітинами.

Висновки.

1. Лейкоцити крові сенсibiliзованих тварин не проявляють цитотоксичної дії на культури клітин підшлункової залози та кісткового мозку.
2. Сироватка крові сенсibiliзованих тварин не виявляє цитотоксичної дії на культуру клітин кісткового мозку, індекс проліферації останніх за використання культури клітин I пасажу становить – 0,97, IV пасажу – 1,02, що аналогічний показникам контролю.
3. Виявлено цитотоксичний ефект сироватки сенсibiliзованих тварин на культуру клітин підшлункової залози який знижувався зі збільшенням пасажів, індекс проліферації за використання ККПЗ I пасажу складав 0,73, IV пасажу – 0,94.

Список літератури

1. Боднар П.М. Актуальні питання діагностики та лікування цукрового діабету / П.М.Боднар, Г.П. Михальчишин // Мистецтво лікування. – 2003. – №1. – С.51–55.
2. Діденко Г.В. Розробка протипухлинних аутовакцин на основі білоквмісних метаболітів *b.subtilis* в-7025 та їх вплив на окремі реакції протипухлинного імунітету (експериментальні дослідження): автореф. дис. на здобуття канд. біол. наук: 14.01.07 /Діденка Генадія Васильовича; М-во освіти і науки України, Ін-т експерим. Патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. – Київ, 2008. 19с.: іл., табл. – Бібліогр. : с. 14-16.
3. Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Данілов В. Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині: навч.посібник для студ. вищ. навч. закладів – К.: КОМПРИНТ – 2014. – 132с.
4. Соколова И.Б. Клеточная терапия сахарного диабета I типа / И.Б.Соколова // Цитология. – 2009. – 51, №12. – С. 964-970.
5. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3th edition / Edward C. Feldman, Richard W. Nelson // Saunders, 2003 – 1104 p.
6. Gao K. Inhibitory effect of mesenchymal stem cells on lymphocyte proliferation /K. Gao, Y. Chen, L. Wei // Cell Biochem. Funct. – 2008. –vol.26, № 8. – P.900-907.

7. Phadnis S.M. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo / S.M. Phadnis, M.V. Joglekar, M.P. Dalvi // *Cytherapy*. – 2011. – Vol.13, No.3. – P. 279-293.
8. Rasmusson I. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T-lymphocytes, but not activated cytotoxic T-lymphocytes or natural killer cells / I. Rasmusson, O. Ringdén, B. Sundberg, K. Le Blanc // *Transplantation*. – 2003. – vol. 76, № 8. – P.1208-1213.
9. Urban V.S. Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes / V.S. Urban, J. Kiss, J. Kovacs [et al.] // *Stem cells*. – 2008. – Vol.26. – P. 244–253.

References

1. Bodnar P.M., Mykhalchyshyn H.P. (2003). Aktualni pytannya diahnozyky ta likuvannya tsukrovoho diabetu [Recent issues of diagnosis and treatment of diabetes] *Art treatment*.1, 51–55 [in Ukrainian].
2. Didenko H.V. (2008). Rozrobka protypukhlynykh autovaktsyn na osnovi bilokvmisnykh metabolitiv b.subtilis v-7025 ta yikh vplyv na okremi reaktsiyi protypukhlynnoho imunitetu (eksperymentalni doslidzhennya) [The development of anticancer vaccines based bilokvmisnyh metabolites b.subtilis in 7025, and their impact on the individual reactions of antitumor immunity (experimental study)] (PhD Manuscript)Kiev[in Ukrainian].
3. Masurkewitsch A. J., Kowpak W. W., Danilow W. B. (2014). Klitinni tehnologii u weterinarnij medyzini. Nawtschal'nij pocibnik [Cellular technology in veterinary medicine. Tutorial]. K.: KOMPRINT [in Ukrainian].
4. Sokolova Y.B. (2009). Kletochnaya terapiya sakharnoho dyabeta I tyipa [Cellular therapy of diabetes mellitus type I] *Cytology*. 51:12,964-970.
5. Edward C. Feldman, Richard W. Nelson (2003). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3th edition. USA:Saunders.
6. GaoK., ChenY., Wei L. (2008).Inhibitory effect of mesenchymal stem cells on lymphocyte proliferation. *Cell Biochem. Funct*.26: 8, 900-907.
7. PhadnisS.M., JoglekarM.V., Dalvi M.P. (2011).Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. *Cytherapy*. 13: 3, 279–293.
8. RasmussonI., RingdénO., SundbergB., Le BlancK. (2003).Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T-lymphocytes, but not activated cytotoxic T-lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 76: 8, 1208-1213.
9. UrbanS., KissJ., Kovacs J.et al. (2008).Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes. *Stemcells*.26, 244–253.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ И СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС ОТНОСИТЕЛЬНО АЛЛОГЕННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В. В. Ковпак

Аннотация. Исследована цитотоксическая активность сыворотки и лимфоцитов крови сенсibilизированных животных относительно культуры клеток костного мозга и поджелудочной железы. Установлено, что лейкоциты крови контрольной и опытной группы не проявляли цитотоксического эффекта на указанные культуры клеток. Стоит отметить, что сыворотка крови сенсibilизированных животных оставалась интактной к культуре клеток костного мозга и индекс пролиферации отвечал контролю. В то же время нами отмечено цитотоксическое влияние сыворотки крови сенсibilизированных животных на культуру клеток поджелудочной железы, которое снижалось с увеличением пассажей, индекс пролиферации с использованием клеток I пассажа составлял 0,73, IV пассажа – 0,94.

Ключевые слова: цитотоксичность, сыворотка крови, лейкоциты, культура клеток костного мозга, культура клеток поджелудочной железы

CYTOTOXIC ACTIVITY OF LEUKOCYTES AND BLOOD SERUM OF RATS RELATIVELY TO ALLOGENIC CULTURES OF BONE MARROW CELLS AND PANCREAS CELLS

V. Kovpak

Abstract. We investigated the cytotoxic activity of serum and lymphocyte sensitized animals relative to culture bone marrow and pancreas. Was established, that blood leukocytes did not show a cytotoxic effect on said cell both the control and the experimental group. It should be noted that the serum of sensitized animals remained intact to the culture of bone marrow cells and the proliferation index posted control. At the same time we have observed cytotoxic effect serum sensitized animal to culture cells of the pancreas, which decreased with increasing passages, index proliferation the use of first-cell passage was 0,73, IV-passage of 0.94.

Keywords: cytotoxicity, serum, white blood cells, bone marrow cell culture, pancreas cell culture