

Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин

при активізації регенеративних процесів в ушкодженій шкірі тварин



Анотація. Досліджено показник кількісного співвідношення CD4+ (Т-хелперів) і CD8+ (Т-супресорів) лімфоцитів крові щурів на фоні застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку з метою корекції репаративних процесів у шкірі цих тварин. Встановлено, що даний показник мав тенденцію до підвищення на 3 добу після формування дефекту шкіри.

Ключові слова: алогенні мезенхімальні стовбурові клітини, Т-лімфоцити-хелпери, Т-лімфоцити-супресори, показник співвідношення Тх/Тс.

The correspondence index of T-helper and T-suppressor lymphocytes after local transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells of the bone marrow with regenerative purpose. MYKOLA O. Malyuk, YURIY O. Kharkevych, VLADISLAV I. Mazurkevych (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine).

Abstract. The correspondence index of CD4+ (T-helper) and CD8+ (T-suppressor) lymphocytes of the blood of rats after transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells of the bone marrow for correction the reparative processes in the skin of these animals were investigated. Was found that this index had tendency to increasing on day 3 after the formation of defect.

Key words: allogeneic mesenchymal stem cells, T-lymphocytes-helpers, T-lymphocytes-suppressors, the ratio of Th/Ts.

М.МАЛЮК, Ю.ХАРКЕВИЧ,

кандидати вет. наук

В. МАЗУРКЕВИЧ, магістр

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Одне із завдань фундаментальної біології – розв'язання проблем реконструкції тканин після їх ушкодження. Не зважаючи на наявність пермісивного мікрооточення, не завжди досягається повне та швидке відновлення ушкодженої тканини. Зокрема, в ряді випадків не відбувається епітелізація глибоких значних ран, не відновлюються ушкодження хрящової тканини суглобової поверхні

кісток тощо. Вирішення цих питань покладено на нову галузь медицини – тканинну інженерію, одним із завдань якої є аналіз можливостей і перспектив застосування клітинної і, зокрема, трансплантації стовбурових клітин для лікування тварин.

Як відомо, стовбурові клітини мають мультипотентну природу, потужний проліферативний потенціал та високу здатність до диференціювання в багато типів клітин живого організму. Особливе місце в цьому посідають мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) – резиденти строми кісткового мозку [9].

Імунологічний моніторинг після алогенної трансплантації полягає в спостереженні за імунною реактивністю реципієнта з метою прогнозування кризи відторгнення. Одним з показників системного імунітету в процесі моніторингу є показник кількісного співвідношення CD4+ (Т-хелперів) і CD8+ (Т-супресорів) лімфоцитів – імунорегуляторний індекс [1].

Мета роботи: вивчити зміни показника кількісного співвідношення CD4+ (Т-хелперів) і CD8+ (Т-супресорів) лімфоцитів крові щурів на фоні застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку.

Експерименти на тваринах були виконані відповідно до вимог «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених І Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

У досліді використовували самок щурів віком 5 місяців із середньою масою 240 г. Тварини були розділені на дві групи по 16 тварин кожна: перша – контрольна; друга – дослідна. Всі маніпуляції з тваринами проводили під загальним наркозом. Дефект шкіри у тварин формували шляхом повношарового видалення її ділянки розміром 1,5x0,5 см в області спини, дотримуючись умов асептики. Тваринам першої групи – контрольної – в ділянку дефекту шкіри вводили фосфатно-буферний розчин, об'ємом 0,5 см³; тваринам другої дослідної групи – в ділянку дефекту шкіри вводили 0,5 см³ фосфатно-буферного розчину із алогенними стовбуровими клітинами в кількості 2 млн. З метою попередження обсіменіння мікроорганізмами, утворений дефект шкіри закривали 1%-им розчином желатину та клеєм БФ-6. На 3, 8, 15 та 24 доби експериментальних досліджень в кожній групі тварин здійснювали евтаназію чотирьох тварин та відбирали проби крові для імунологічних досліджень.

Лімфоцити отримували шляхом центрифугування проб стабілізованої гепарином крові у фікол-тріомб-растовому радієнті щільності ($\rho = 1,077$) протягом 25 хв при відцентровій силі 300 g. 0,5 %-у завись еритро-

цитів барана готували шляхом трьохразового відмивання осаджених еритроцитів гепаринізованої крові від плазми максимальними об'ємами фізіологічного розчину, центрифугуючи зразки протягом 10 хв при відцентровій силі 300 g. Після заключного центрифугування з осаду відбирали 0,1 см³ еритроцитів та вносили в пробірку з 19,9 см³ середовища 199.

Для визначення загальної кількості активованих Т-лімфоцитів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана в центрифужні пробірки вносили по 0,1 см³ 0,5 %-ої завись еритроцитів та 0,1 см³ суспензії лімфоцитів в робочій концентрації (2,0 x 10⁶ в 1 см³ суспензії), змішували. Суміш інкубували 10 хв при температурі 37 °С та центрифугували 5 хв при відцентровій силі 200 g. Після центрифугування пробірки ставили на 18 год в холодильник ($t = 2-4$ °С). Після цього лімфоцити обережно ресуспензовували і в камері Горяєва визначали відсоток розеткоутворюючих клітин (власне Т-лімфоцитів).

Для визначення теофілінрезистентних Т-лімфоцитів методом розеткоутворення з еритроцитами барана в центрифужні пробірки вносили по 0,1 см³ суспензії лімфоцитів в робочій концентрації та 0,1 см³ 0,01 М розчину теофіліну, інкубували в термостаті протягом 1 год при температурі 37 °С. Після закінчення інкубації в пробірки з обробленими теофіліном лімфоцитами додавали по 0,1 см³ 0,5 %-ої завись еритроцитів та змішували. Суміш інкубували 10 хв при температурі 37 °С та центрифугували 5 хв при 200 g. Після центрифугування пробірки ставили на 18 год в холодильник ($t = 2-4$ °С). Після цього лімфоцити обережно ресуспензовували і в камері Горяєва визначали відсоток розеткоутворюючих клітин, які відповідають теофілінрезистентним Т-лімфоцитам (Т-хелперам).

Для вирахування теофілінчутливих Т-лімфоцитів (Т-супресорів) від загальної кількості активованих

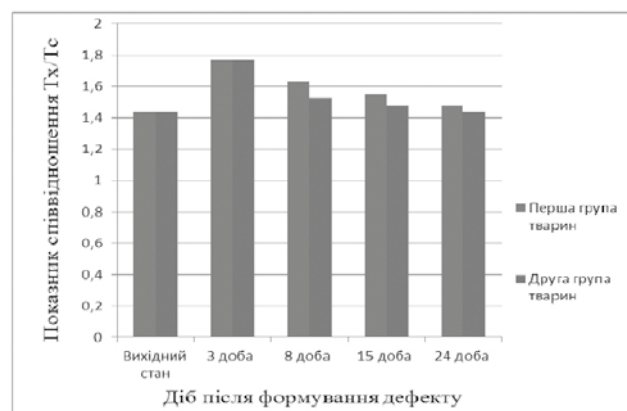


Рис. 1. Динаміка зміни співвідношення T_x/T_c у тварин контрольної та дослідної груп протягом репаративного процесу

Співвідношення Тх/Тс у тварин контрольної та дослідної груп протягом репаративного процесу, (n=4, M±m)

Групи тварин	Вихідний стан (контроль)	3 доба після формування дефекту	8 доба після формування дефекту	15 доба після формування дефекту	24 доба після формування дефекту
	Співвідношення Тх/Тс				
Перша	1,44±0,04	1,77±0,15	1,63±0,09	1,55±0,17	1,48± 0,06
Друга	1,44±0,04	1,77±0,15	1,53±0,16	1,48±0,06	1,44±0,06

Т-лімфоцитів віднімали кількість теофілінрезистентних Т-лімфоцитів.

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз результатів досліджень показав, що показник кількісного співвідношення CD4+ (Т-хелперів) і CD8+ (Т-супресорів) лімфоцитів крові контрольної та дослідної груп щурів протягом репаративного періоду відрізняється.

Так, при порівнянні співвідношення Тх/Тс у тварин контрольної та дослідної груп протягом репаративного процесу була помічена тенденція до його підвищення на 3 добу після формування дефекту та поступове зниження на 8, 15 та 24 доби, порівняно з вихідним станом (табл. 1, рис. 1).

При порівнянні співвідношення Тх/Тс у тварин контрольної та дослідної груп відносно одна одної протягом експерименту не було виявлено достовірних змін. Проте, слід відмітити менше значення даного показника на 8, 15 та 24 доби у тварин, яким застосували алогенні МСК, порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 1, рис. 1).

Як відомо, підвищене співвідношення Тх/Тс нерідко спостерігається в гострій фазі різних запальних процесів та виступає фактором ризику кризи відторгнення при алогенній трансплантації [1; 2].

На перших етапах розвитку запального процесу, зазвичай, спостерігається високе співвідношення Тх/Тс. У другій його половині, ближче до завершення та зникнення клінічних проявів запалення, виявляють зниження співвідношення Тх/Тс [2; 3].

Така динаміка зміни показника співвідношення Тх/Тс під час нормально протікаючого запального процесу підтверджує посилену роботу імунної системи організму для знищення чужорідного і є позитивною прогностичною ознакою.

У нашому дослідженні ми спостерігали тенденцію до підвищення співвідношення Тх/Тс на 3 добу після формування дефекту шкіри, що, очевидно, пов'язано

саме з перебуванням регенеративного процесу у фазі запалення.

Зниження показника співвідношення Тх/Тс на 8, 15 та 24 доби експерименту до рівня вихідного стану є свідченням врівноваження імунної системи тварин, що співпадає із закінченням запального та поступовим завершенням регенеративного процесів у шкірі (табл. 1, рис. 1) [4].

Менший показник співвідношення Тх/Тс на 8, 15 та 24 доби у тварин, яким застосували алогенні МСК, порівняно з тваринами контрольної групи, ймовірно, є результатом відсутності імуногенності у даних клітин та їх більшого стимулюючого впливу на перебіг репаративних процесів у шкірі, порівняно з контролем, коли застосовували лише фізіологічний розчин, а, отже, і швидший перехід фази запалення у фазу проліферації [1; 5; 7; 8].

Зниження показника співвідношення Тх/Тс в кінці експерименту до рівня вихідного стану в тварин усіх груп є ознакою зникнення запальної реакції на uszkodження шкіри та завершення регенеративного процесу.

Висновки

Показник співвідношення Т-лімфоцитів-хелперів/Т-лімфоцитів-супресорів має тенденцію до підвищення на 3 добу після формування дефекту шкіри.

Показник співвідношення Т-лімфоцитів-хелперів/Т-лімфоцитів-супресорів має менше значення на 8, 15 та 24 доби після формування дефекту шкіри у тварин, яким застосовували алогенні мезенхімальні стовбурові клітини, порівняно з тваринами контрольної групи, що свідчить про їх стимулюючий вплив на перебіг репаративних процесів у шкірі та відсутність імуногенних властивостей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – Одесса: «Астро Принт», 1999. – 603с.

2. Лебедев К.А. Иммунология в клинической практике.– М.: «Электронная медицинская книга», 1996.– 387с.
3. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике.– М.: Наука, 1990.– 224с.
4. Мазуркевич А.Й., Харкевич Ю.О., Малюк М.О., Данілов В.Б., Ковпак В.В., Журба В.І. Вплив мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та ембріональних фібробластів щурів на перебіг репаративних процесів у їхній шкірі.// Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України.– 2010.– Вип. 151, Ч 1.– С.197–205.
5. Расулов М.Ф., Василенко В.Т., Зайденев В.А. и др. Клеточная трансплантация ослабляет воспалительную реакцию и стимулирует репаративные процессы в ожоговой ране. // Клеточные технологии в биологии и медицине.– 2006.– №3.– С. 127–132.
6. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. // Blood.– 2005.– 105.– P. 1815–1822.
7. Augello A., Tasso R., Negrini S.M. et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. // Eur. J. Immunol.– 2005.– 35.– P. 1482–1490.
8. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. // Blood.– 2002.– 99.– P. 3838–3843.
9. Yuehua Jiang, Balkrishna N. Jahagirdar, R. Lee Reinhardt et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. // Nature.– 2002.– 418.– 41–49.

УДК 363.2:577.115.16 : 546.41.18

D-вітамінний статус і метаболічний профіль крові корів у зоні Передкарпаття за сезонністю

Анотація. Наведено дані про сезонну динаміку забезпеченості вітаміном D корів української чорно-рябої молочної породи в умовах природньо-географічної зони Передкарпаття. Встановлено зміни показників мінерального, ліпідного і білкового обміну на фоні вмісту 25-гідроксिवітаміну D у крові корів у різні сезони року.

Ключові слова: корови, вітамін D, метаболізм, кров, 25-гідроксихолекальциферол, кальцій, фосфор, магній, лужна фосфатаза, ліпіди

Influence of season on vitamin D status indicators and metabolic profile of blood in cows in the natural geographical areas of precarpathians YUSKIV L. (Institute of Animal Biology NAAN)

Abstract. Researched the seasonal dynamics of Vitamin D provision rate in cows of the Ukrainian Black-and-White dairy breed, which were held at the natural geographical areas of Precarpathians. Established that the content of the active metabolite of vitamin D₃ — 25-OHD₃ in blood of cows during lactation period was the highest in summer-pasture period, and the lowest — in the winter-stall period.

Key words: cows, vitamin D, metabolism, blood, 25-hydroxycholecalciferol, calcium, phosphorus, magnesium, alkaline phosphatase, lipids.

Л. ЮСЬКІВ, канд.вет.наук

Інститут біології тварин НААН

В організмі корів у період лактації підвищується інтенсивність мінерального обміну, а тому важливе значення має ступінь забезпеченості

їх організму жиророзчинними вітамінами, зокрема вітаміном D. Це зумовлено стимулюючим впливом його активних метаболітів на різні ланки обміну речовин та процеси проліферації у молочній залозі [1-4]. 1,25(OH)₂D₃ через вплив на рецептори у молочній залозі стимулює транспорт Ca у молочну залозу [4]. Дослідженнями встановлено, що вміст вітаміну D і його метаболітів у молоці залежить від D-вітамінного статусу корів [5-7]. Тому із збіль-

* Рецензенти: докт.вет.наук, І.Я. Коцюмбас, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок; докт.вет.наук, професор Д.Ф.Гуфрій, ЛНУ вет. медицини та біотехнологій ім. С.З.Гжицького