УДК 619:611.018:612.017:636

Імунітет тварин-реципієнтів за експериментального введення стовбурових клітин

Анотація. *Досліджено показники абсолютної кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій у крові кролів, а також імунорегуляторний індекс після введення їм у кровоносне русло ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин. Встановлено, що ксеногенні мезенхімальні стовбурові клітини не мають імуногенних властивостей та проявляють недовготривалу імуносупресивну дію, що проявляється зниженням на 3-ю добу експерименту у їх крові абсолютної кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій. Імуносупресивний вплив введених in vivo ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин найбільш виражено позначається на популяції В-лімфоцитів. Показник імунорегуляторного індексу при введенні in vivo ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин підвищується.*
Ключові слова*: ксеногенні мезенхімальні стовбурові клітини, абсолютна кількість лейкоцитів, імуносупресивна дія, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, імунорегуляторний індекс.*

The influence of xenogenic mesenchymal stem cells on indicators of cellular immunity after systemically administration for recipient animals*. ANATOLIY Y. Mazurkevych, MYKOLA O. Malyuk, YURIY O. Kharkevych, Taras L. Savchuk (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine).*
Abstract. *Researched the indicators of absolute number of leukocytes and their subpopulations in the blood of rabbits and immunoregulatory index after administrating into their blood stream of xenogenic mesenchymal stem cells. Established that xenogenic mesenchymal stem cells do not possess immunogenic properties and show short-lived immunosuppressive effect, manifested in reducing of the absolute number of leukocytes and their subpopulations in their blood on the 3rd day of the experiment. Immunosuppressive effect of xenogenic mesenchymal stem cells vivo is most pronounced on the population of B-lymphocytes. Immunoregulatory index after administratingin vivo of xenogenic mesenchymal stem cells increases.*
Key words: *xenogenic mesenchymal stem cells, the absolute number of leukocytes, immunosuppressive action, T-lymphocytes, B-lymphocytes, immunoregulatory index.*

А. МАЗУРКЕВИЧ*, докт.вет. наук*
М.МАЛЮК , Ю ХАРКЕВИЧ,
кандидати вет. наук
Т.САВЧУК, *магістр*
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Мультипотентні сторомальні мезенхімальні клітини (МСК), являють собою один із найбільш цікавих об'єктів для біологічної науки не лише завдяки їх здатності генерувати клітини кісткової, жирової і хрящової тканини, але й внаслідок своїх імуносупресивних властивостей, які дають змогу розглядати МСК у якості цінного засобу щодо подолання патологічних запальних процесів і забезпечення імунної толерантності при органній трансплантації та аутоімунних захворюваннях [11].

Так, дослідження останніх років виявили, що МСК мають імуносупресивні властивості. Перші відомості

про імуносупресивні властивості стовбурових клітин були одержані в дослідженнях МСК людини, мавпи та мишовидних гризунів. Було показано, що МСК здатні супресувати активацію та проліферацію імунокомпетентних клітин *in vitro* [9, 10, 14, 15].

Хоча дослідженнями in vitro було продемонстровано, що МСК здатні супресувати активацію та проліферацію імунокомпетентних клітин і ця властивість є універсальною, достеменно не відомо, які реакції виникають *in vivo* після введення мезенхімальних стовбурових клітин у кров. Водночас, результати ряду досліджень *in vivo* демонструють, що після інфузії в кровоносне русло алогенні МСК уникають відповіді імунної системи реципієнта, що, очевидно, пов'язано з їх поверхнево-клітинним фенотипом, який погано розпізнається імунними клітинами та здатністю модулювати імунну відповідь шляхом індукції регуляторних Т-лімфоцитів із супресивним фенотипом [4; 7;8; 13].

Отже, багато питань щодо імуносупресивних властивостей МСК залишаються відкритими і тому досить актуальним є вивчення реакції імунної системи тварин-реципієнтів на введення клітин чужорідного походження.

Мета роботи – дослідити показники абсолютної кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій у крові кролів, а також імунорегуляторний індекс після введення їм у кровоносне русло ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин.

Мезенхімальні стовбурові клітини одержували з аспірату кісткового мозку собаки. При цьому, аспірат кісткового мозку розбавляли фосфатно-буферним розчином у співвідношенні 1:3, нашаровували на попередньо внесений у стерильні пробірки розчин із градієнтом щільності ρ=1,072(фікол) та центрифугували протягом 25 хв при відцентровій силі 300 g [1]. Здобуті таким чином мононуклеарні клітини вносили в чашки Петрі та культивували при температурі 37 ^{0}С та 5%-му вмісті CO_2 у стандартному культуральному середовищі з вмістом 80 % DMEM, 20 % ембріональної сироватки теляти та 10 мкл/мл середовища антибіотика-антимікотика. Мікроскопічний аналіз культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс). На третьому пасажі культуру клітин з допомогою розчину трипсину/ЕДТА МСК знімали із чашок Петрі, суспендували у фосфатно-буферному розчині і вводили кролям у яремну вену у кількості $3x10^6$ клітин на тварину. Загальний об'єм введеної суспензії МСК становив 2 мл.

Загальну кількість лейкоцитів підраховували у камері Горяєва, а лімфоцитів та їх субпопуляцій визначали за допомогою тесту розеткоутворення з еритроцитами барана.

Для підрахунку загальної кількості лейкоцитів 0,02 см^3 крові вносили в пробірку з 0,38 см^3 3 %-ого розчину оцтової кислоти, яка має властивість гемолізувати еритроцити. Таким чином, отримували розведення крові в 20 разів.

Краплею розведеної крові заправляли камеру Горяєва та під малим збільшенням мікроскопу в 100 великих квадратах підраховували лейкоцити.

Розрахунок загальної кількості лейкоцитів проводили за формулою:

X = a x 20/100 x b,

де X – к-сть лейкоцитів у 1 мкл крові;

a – к-сть підрахованих лейкоцитів у 100 великих квадратах;

b – об'єм одного великого квадрату ($4,0x10^{-3}$мкл);

20 – ступінь розведення крові;

100 – к-сть великих квадратів, у яких проводився підрахунок.

Лімфоцити одержували шляхом центрифугування проб стабілізованої гепарином крові у фікол-тріомбрастовому градієнті щільності за методом Boyum A. [6].

Визначення кількості Т-лімфоцитів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана проводили за методикою, запропонованою Jondal M. et al. [12].

Кількість В-лімфоцитів методом розеткоутворення з еритроцитами барана, обробленими антитілами та комплементом, проводили за методикою, запропонованою Bianco C. et al. [5].

Результати досліджень свідчать, що ксеногенні мезенхімальні стовбурові клітини (собаки) при введенні у кровоносне русло кролям змінюють вміст у їх крові абсолютної кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій (табл. 1, рис. 1). Одержані показники вказують на те, що ксеногенним мезенхімальним стовбуровим клітинам не притаманні імуногенні властивості, вони проявляють недовготривалу імуносупресивну дію.

Так, на 3-ю добу після введення МСК у крові кролів достовірно знизився абсолютний вміст лейкоцитів. Їх кількість становила 4,8Г/л, що на 20,4 % менше порівняно з вихідними станом. Кількість лейкоцитів повернулася у межі вихідного стану вже на 7-му добу експерименту та трималася на даному рівні з деяким коливанням включно до 23-ї доби (табл. 1, рис. 1).

Абсолютна кількість лімфоцитів у крові кролів також була достовірно нижчою на 3-ю добу після введення МСК та становила 3,90Г/л, що становить 85,5 % від вихідного стану (табл. 1, рис. 1). Варто зазначити, що вже на 7-у добу даний показник був достовірно вищим на 10,7 % порівняно з вихідним станом та знизився лише на 23-ю добу. Як видно з даних таблиці, зростання абсолютної кількості лімфоцитів на 7-у добу досліджень відбулося у першу чергу за рахунок субпопуляції 0-клітин та менше – Т-лімфоцитів, що, насамперед, наштовхує на пояснення можливого механізму імуносупресивного впливу ксеногенних МСК (табл. 1). З літературних джерел відомо, що

Вплив ксеногенних МСК на зміни показників клітинної ланки імунітету у тварин реципієнтів (M±m, n=4)

Показники	Вихідний стан	3 доба	7 доба	23 доба
Лейкоцити, Г/л	6,03±0,16	4,8±0,36*	6,4±0,15	5,8±0,11
Лімфоцити, Г/л	4,56±0,03	3,90±0,26*	5,04±0,1**	4,1±0,6
Т-лімфоцити, Г/л	0,73±0,02	0,53±0,06**	0,85±0,05**	0,74±0,12
Т-хелпери, Г/л	0,41±0,02	0,32±0,05	0,52±0,02**	0,41±0,09
Т-супресори, Г/л	0,32±0,01	0,21±0,01**	0,32±0,03	0,26±0,03
Імунорегуляторний індекс (співвідношення Тх/Тс)	1,28**	1,52	1,63**	1,58
В-лімфоцити, Г/л	0,66±0,02	0,37±1,08**	0,32±0,03**	0,38±0,08**
0-лімфоцити, Г/л	3,17,0,01	3,07±0,12	3,69±0,2	2,84±0,39

*Примітка * p < 0,05;** p < 0,01; ***p < 0,001*

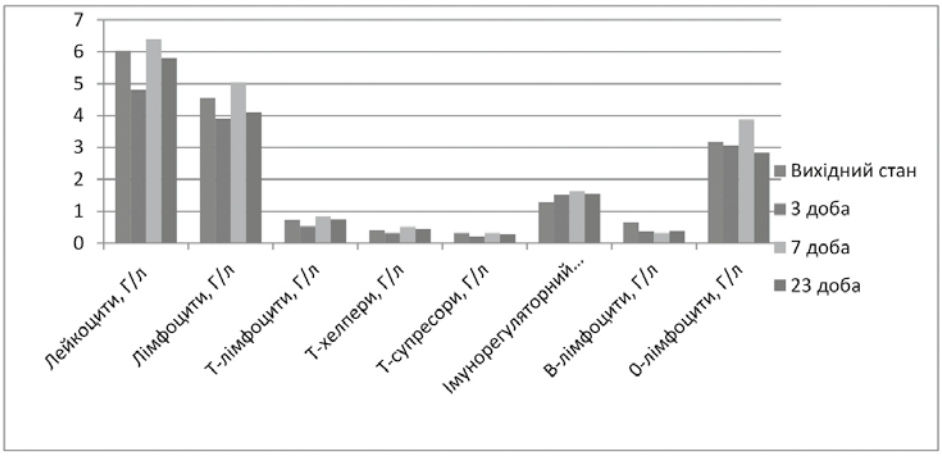
нульові лімфоцити – це гетерогенна фракція клітин, яка не має характерних маркерів Т і В-лімфоцитів. В цю фракцію, зокрема, входить незначна кількість попередників лімфоїдних клітин, недиференційованих лімфоцитів і NK-клітини [3]. Згідно з іншими науковими джерелами відомо, що нульові лімфоцити – це переважно клітини із зниженою функціональною активністю: або юні, недозрівші, або старіючі, дефектні лімфоцити, або клітини, тимчасово позбавлені рецепторів чи, які мають заблоковані рецептори Т- і В-лімфоцитів [2].

У більшості випадків зміна рівня 0-клітин визначається Т-лімфоцитами, оскільки у периферійній крові цих клітин дещо більше, ніж В-лімфоцитів. Тому дуже часто збільшення абсолютної кількості нульових клітин супроводжується паралельним зниженням кількості Т-лімфоцитів. Аналізуючи дані таблиці, можна помітити, що у нашому дослідженні на 7-у добу експерименту рівень Т-лімфоцитів, навпаки, достовірно зріс на 16,4 % порівняно з вихідним станом, проте достовірно знизився на 51,5 % вміст В-клітин (табл., рис.). Слід зазначити, що абсолютний вміст В-лімфоцитів у крові кролів був достовірно нижчим порівняно з вихідним станом протягом усього періоду досліджень, що може бути пояснено зниженою їх міграцією під впливом МСК з органів імуногенезу у периферійну кров, а також зниженою проліферативною активністю. Таким чином, можна зробити висновок, що ксеногенні МСК в основному впливають на фізіологічну активність саме В-лімфоцитів, і менше - на Т-клітини, хоч цей вплив також присутній.

Це також підтверджується тим, що зниження абсолютної кількості лімфоцитів у крові кролів на 3-ю добу після введення МСК відбувається переважно за рахунок В-лімфоцитів. Так, кількість В-клітин достовірно знизилась на 44 % порівняно з вихідним станом, тоді як Т-клітин – на 27,4 % (табл., рис.).

Переважний імуносупресивний вплив введених МСК саме на популяцію В-лімфоцитів ілюструє також той факт, що показник імунорегуляторного індексу (кількісного співвідношення Т-хелперів і Т-супресорів) був вищим протягом усього періоду дослідження порівняно з вихідним станом. Як відомо, зростання показника імунорегуляторного індексу, зазвичай, спостерігається на фоні стимуляції імунної системи. Таким чином, у нашому дослідженні ми виявили своєрідний конфлікт у імунній системі: на фоні високого показника імунорегуляторного індексу на 3-ю добу після введення ксеногенних МСК абсолютна кількість лейкоцитів та їх субпопуляцій у крові кролів достовірно знижується та повертається до показників вихідного стану на 23-ю добу (табл., рис.). Очевидно, значну роль у регуляції рівня імунокомпетентних клітин у кровоносному руслі відіграє не лише співвідношення Т-хелперів і Т-супресорів, а й їх абсолютна кількість (сумарний ефект).

Таким чином, результати досліджень імунологічних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин *in*



Динаміка вмісту абсолютної кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій у крові кролів, а також імунорегуляторного індексу після введення їм у кровоносне русло ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин

vivo, отримані нами, узгоджуються з даними зарубіжних вчених [4, 7, 8, 10, 13].

Водночас, не до кінця виясненим та зрозумілим залишається механізм цього впливу.

Висновки

Ксеногенні мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (собаки) при введенні у кровоносне русло кролям проявляють недовготривалу імуносупресивну дію, що проявляється зниженням на 3-ю добу експерименту у їх крові абсолютної кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій.

Імуносупресивний вплив введених *in vivo* ксеногенних мультипотентнихмезенхімальних стромальних клітин найбільш виражено позначається на популяції В-лімфоцитів.

Показник імунорегуляторного індексу (кількісного співвідношення Т-хелперів і Т-супресорів) при введенні *in vivo* ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин підвищується.

ЛІТЕРАТУРА

1. ***Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Харкевич Ю.О., Сушко М.І***. *Спосіб отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліферативною активністю. / Патент України на корисну модель №50905, МПК (2009) А61К 35/28 №u200913880. Заявл. 29.12.2009. Опубл. 25.06.2010. Бюл. №12.*
2. ***Лебедев К.А.*** *Иммунология в клинической практике.– М.: «Электронная медицинская книга».– 1996.– С. 387.*
3. ***Ярылин А.А.*** *Основы иммунологии.– М.: Медицина, 1999.– С. 51–53.*
4. ***Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskasetal M.*** *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo/ A. Bartholomew. // Exp. Hematol.– 2002.– Vol.30.– P. 42–48.*
5. ***Bianco C., Prilrick R., Nussenzweig V.A.*** *Population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complex. // J. Exp. Med.– 1970.– Vol. 134, №4.– P. 702–720.*
6. ***Boyum A.*** *Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. // Tissue antigens.– 1974.– №4.– P. 269–274.*
7. ***Casiraghi F., Azzollini N., Cassis P.*** *et al. Pretransplant Infusion of Mesenchymal Stem Cells Prolongs the Survival of a Semi allogeneic Heart Transplant through the Generation of Regulatory T Cells. // The Journal of Immunology.– 2008.– Vol. 181.– P. 3933–3946.*
8. ***Devine S.M., Jennings M. Cobbs, Bartholomew A.*** *et al.Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into non human primates. // Blood.– 2003.– Vol.101.– P. 2999–3001.*
9. ***DiNicola M., Carlo-Stella C., Magnietal M***. *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non specific mitogenic stimuli. // Blood.– 2002.– Vol. 99.– P. 3838–3843.*
10. ***Djouad F., Plence P., Bony C.*** *et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor grow thin allogeneic animals. // Blood.– 2003.– Vol. 102.– P. 3837–3844.*
11. ***Dominici M., Le Blanc K., Mueller I.*** *et. al. Minimal criteria for multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for cellular Therapy position statement. // Cytoterapy.– 2006.– Vol. 8.– P. 315–317.*
12. ***Jondal M., Holm G., Wigzell H.*** *Surface marker son human T and B lymhocytes: A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep blood cells. // J. exp. Med.– 1972.– Vol. 136, №2.– P. 207–215.*
13. ***Koc O.N., Day J., Nieder M.****et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPSIH). // Bone Marrow Transplantation.– 2002.– Vol.30.– P. 215–222.*
14. ***Rasmusson I.*** *Immune modulation by mesenchymal stem cells. // Exp. CellRes.– 2006.– Vol.312.– P. 2169–2179.*
15. ***Tse W.T., Pendleton J.D., Beyeretal W.M.*** *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. // Transplantation.– 2003.– Vol.75.– P. 389–397.*