

## Роль мезенхимальных стромальных клеток в остеоиммунных процессах

В.М.Оксимец

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького  
Донецк, Украина

В статье приведены результаты функционально-фенотипических исследований культивированных линий мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека — некоммутированных и коммутированных по остеогенному пути. Полученные данные обобщены в рамках концепции об остеоиммунитете. В статье рассмотрены возможные пути активации остеорепарации и представлена остеоиммунная концепция восстановления нарушенных остеорепаративных процессов трансплантированными аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками у травматологических пациентов.

**Ключевые слова:** остеоиммунитет, мезенхимальные стромальные клетки, остеорепаративный процесс, остеогенная индукция, щелочная фосфатаза, клеточный фенотип, CD-маркеры, цитокины.

### ВВЕДЕНИЕ

На процессы физиологической регенерации кости непосредственное влияние оказывает иммунная система. В последнее время в мировой литературе начала формироваться концепция о существовании остеоиммунной системы, функционирование которой тесно связано с процессами активации клеточного и гуморального иммунитета [3, 5-7]. Впервые термин «остеоиммунология» был предложен в 2000 г. J. Aaron и Y. Choi [1]. В своей работе авторы указали на наличие тесной взаимосвязи иммунной и скелетной систем при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Регуляция остеоиммунных процессов осуществляется как на системном уровне, посредством иммунорегуляторных гормонов — парат-гормона, половых

гормонов, глюкокортикоидов [3], так и на местном уровне за счет таких факторов, как, например, инсулиноподобный фактор роста (ИФР), трансформирующий фактор роста  $\beta$  (ТФР- $\beta$ ), костные морфогенетические белки (КМБ), фактор роста фибробластов (ФРФ), а также цитокины (ЦК) [2]. Но если роль большинства общих и местных факторов в процессах физиологической регенерации костной ткани в литературе описана достаточно широко, то работы, посвященные изучению роли ЦК, продуцируемых неиммунными клеточными источниками, в процессах остеогенеза, остеорепарации и костной резорбции в доступной литературе отсутствуют.

В течение последних 10-15 лет в литературе уделяется большое внимание изучению роли мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК) в процессах репаративного остеогенеза. Однако в литературе отсутствуют работы, изучающие функциональную и регуляторную роль клеток-предшественников, в том числе МСК, при остеопатологических состояниях, в частности при нарушениях репаративного остеогенеза. МСК, являясь основой клеточного дифферона костной ткани [17], могут выступать как потенциальные индукторы остеоиммунных процессов в репаративном остеогенезе. Поэтому изучение иммунных механизмов влияния МСК на заживление костной раны является весьма актуальным для изучения процессов нарушенной остеорепарации и разработки технологий трансплантации МСК. Показано, что трансплантация аутологичных МСК способствует остеогенезу в «замершей» костной ране и позволяет возобновить целостность костной ткани при ее дефектах [8, 15, 18, 19].

Целью работы является определение иммунорегуляторной роли трансплантированных культивированных мезенхимальных стромальных клеток в восстановлении нарушенных процессов остеорепарации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МСК изолировали согласно общепринятой методике [4] из костного мозга, полученного пункционным методом из грудины или гребня подвздошной кости у пациентов травматологического профиля и культивировали в ростовой среде DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбрионной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и митогенов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Joan, Франция) при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>.

Изучение продукции щелочной фосфатазы (ЩФ), мембранных поверхностных рецепторов (фенотипирование) и продукции ЦК осуществляли как у некоммутированных МСК (1 группа клеток), так и у коммутированных по остеогенному пути МСК (2 группа клеток). Остеогенную индукцию МСК осуществляли путем внесения в ростовую среду 0,1 мкМ дексаметазона, 10 мМ β-глицерофосфата и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma, США).

Определение ЩФ в супернатанте клеточных культур МСК проводили цитохимическим методом с применением субстрата BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma, США) согласно инструкции. Количественное определение ЦК в клеточном супернатанте осуществляли иммуноферментным методом твердофазным сэндвичем — BD ORTEGA Human ELISA (BD Biosciences, США). Мембранные поверхностные рецепторы определяли с помощью моноклональных антител (МКА) в культурах некоммутированных и коммутированных по остеогенному пути МСК. В исследованиях использовались МКА, рекомендованные для специфического маркирования поверхностных антигенов 8-м Международным рабочим совещанием по вопросам лейкоцитарных антигенов дифференцирования человека (The 8th International HLDA Workshop and Conference, Adelaide, Australia, 2004). Все МКА и изотип-контроли были производства BD Biosciences (США). Количественное определение ЦК осуществляли на основании измерения оптической плотности полученного раствора с использованием фотометра для многофункционального анализа Synergy HT Bio-Tek Instruments и программы KC4 System (США).

Полученные данные были выражены как среднее значение со стандартной ошибкой среднего и статистически проанализированные с помощью t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В статьях, опубликованных ранее [8, 11, 14, 15], было предоставлено теоретическое обоснование функционального иммунорегуляторного статуса и изменения рецепторного аппарата и цитокиновой продукции у некоммутированных и коммутированных по остеогенному пути МСК. В данной статье осуществляется обобщение экспериментальных данных, полученных при изучении функционально-фенотипических особенностей культивированных МСК человека.

Полученные данные свидетельствуют о том, что коммутированные по остеогенному пути МСК человека с 10 сут. индукции начинают продуцировать ЩФ (она же остаза — маркерный фермент остеобласта и остеогенных линий) на уровне 78% (p<0,05). Максимальное количество позитивных по ЩФ культур наблюдалось с 13-х по 19-е сутки остеоиндукции — 90% (p<0,05). Было установлено, что на протяжении трехнедельного процесса остеогенной индукции МСК изменяют свою морфологию — с фибробластоподобных, недифференцированных, активно пролиферирующих и не продуцирующих ЩФ клеток в начале индуцирования до почти непролиферирующих, распластанных, отросчатых, округломногоугольных клеток, которые активно продуцируют ЩФ [8].

Общими мембранными антигенами для некоммутированных и остеоиндуцированных МСК человека при их культивировании являются: Cd44, Cd166, Cd58, CD62L, CD29, CD49b, CD49c и CD54. Не идентифицируются Cd49a и HLA A, B, C. После остеоиндукции коммутированные МСК, в отличие от некоммутированных, начинают экспрессировать HLA-DR на уровне единичных клеток (p<0,05) и прекращают экспрессировать CD56 (p<0,05) [10] (табл. 1).

Общий спектр иммунорегуляторных цитокинов, которые продуцируются некоммутированными и коммутированными по остеогенному пути культурами МСК человека в условиях культивирования, представлен интерлейкинами — ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-α. Впервые было показано наличие секреции культивируемыми некоммутированными МСК ИЛ-1β (32,7±4,9 пг/мл) и ИЛ-2 (10,4±1,4 пг/мл) и отмечено увеличение уровня секреции МСК этих интерлейкинов в процессе остеогенной индукции (ИЛ-1β — до 47,8±3,2 пг/мл и ИЛ-2 — до 14,4±0,5 пг/мл (p<0,05)). Впервые было отмечено наличие гиперпродукции ИЛ-6 и ИЛ-8 культивируемыми некоммутированными (ИЛ-6 — 101,4±3,2 пг/

ТАБЛИЦА 1

Балльная оценка иммуномаркирования некоммутированных и остеоиндуцированных МСК человека ( $M \pm m$ )

CD	Антиген	Некоммутированные МСК		Коммутированные МСК	
		1-2 (n=5)	3-4 (n=17)	1-2 (n=12)	3-4 (n=13)
<b>Уровень экспрессии молекул активации и ко-стимуляции</b>					
58	LFA-3	1,6±0,2	1,6±0,2	1,4±0,2	1,5±0,1
166	ALCAM	3,8±0,2	3,9±0,1	4,8±0,1	4,9±0,1
56	NCAM	3,8±0,2	3,9±0,1	0,3±0,1*	0,2±0,1*
54	ICAM-1	1,2±0,2	2,5±0,2	2,7±0,1*	2,8±0,1
<b>Уровень экспрессии молекул эндотелийопосредованной адгезии</b>					
62L	L-селектин, LECAM-1	1,8±0,4	1,9±0,2	1,7±0,1	2,1±0,2
<b>Уровень экспрессии молекул межклеточной адгезии</b>					
44	HCAM	4,8±0,2	4,9±0,1	4,9±0,1	5,0
<b>Уровень экспрессии интегриновых субъединиц</b>					
29	интегрин $\beta 1$	2,8±0,2	2,7±0,1	3,1±0,2	3,5±0,2*
49a	интегрин $\alpha_1$	0	0	0,2±0,1	0
49b	интегрин $\alpha_2$	3,6±0,2	3,9±0,1	3,5±0,2	3,8±0,1
49c	интегрин $\alpha_3$	3,2±0,2	3,3±0,1	2,7±0,1	3,0±0,2
<b>Уровень экспрессии молекул HLA</b>					
–	HLA A, B, C	0	0	0	0
–	HLA-DR	0	0	0,3±0,1	0,5±0,1*

**Примечание:** \* — обозначено статистически значимое изменение ( $p < 0,05$ ) экспрессии антигена коммутированными МСК в сравнении с некоммутированными.

мл, ИЛ-8 —  $262,0 \pm 25,0$  пг/мл ( $p < 0,05$ )) и коммутированными по остеогенному пути МСК человека (ИЛ-6 — до  $276,5 \pm 5,6$  пг/мл, ИЛ-8 — до  $106,6 \pm 4,3$  пг/мл ( $p < 0,05$ )) [11].

Обобщение полученных ранее данных позволяет ответить на вопрос, в чем выражается остеоиммунная и иммунорегуляторная роль трансплантированных в область «замершей» костной раны аутологичных культивированных МСК. Для ответа на данный вопрос необходимо сопоставить результаты функционально-фенотипических исследований МСК с известными остеоиммунными и иммунорегуляторными механизмами и фазами течения процесса остеорепарации, начиная с перелома и возникновения нарушений заживления костной раны и заканчивая финальной фазой образования пластинчатой и губчатой костной структуры *de novo* [16].

Полученные данные позволяют говорить о том, что трансплантированные культивированные аутологичные МСК за счет поверхностной экспрессии разных функциональных молекул и секреции ЦК выступают эффектив-

ными активаторами нарушенного остеорепаративного процесса и остеоиммунных взаимодействий. Спектр поверхностных антигенов, экспрессируемых культивированными МСК, можно схематически обобщить в несколько функциональных групп (табл. 1). Группа поверхностных антигенов, которые принимают участие в клеточно-матриксных взаимодействиях и содействуют развитию процессов миграции МСК в ране и остеообластогенезу — это CD29, CD49b, CD49c и CD44. Группа поверхностных антигенов, которые принимают участие в процессе привлечения на место костного дефекта клеток моноцитарно-макрофагального ряда (в том числе преостеокластов), — CD54. Группа поверхностных антигенов, которые принимают участие в процессе активации иммунокомпетентных клеток, которые запускают развитие реакций звена специфического иммунитета, — это CD54, CD58, CD62L и CD166.

В литературе имеются данные относительно взаимодействий «лимфоцит-остеобласт», согласно которым остеобласты обладают антиген-

презентирующими свойствами и экспрессируют молекулы МНС II класса и адгезины CD54 (ICAM-1) и CD166 (ALCAM), которые активируют Т-клетки [4]. Коммитированные по остеогенному пути МСК, так же как и остеобласты, экспрессируют CD54, CD166 и, следовательно, как и остеобласты, могут активировать Т-клетки. Группа поверхностных антигенов CD56 и CD58 принимает участие в процессе активации иммунокомпетентных клеток и запускает развитие реакций звена неспецифического иммунитета. Наряду с поверхностными мембранными рецепторами, свое влияние на процессы неспецифического иммунитета МСК осуществляют посредством секретируемых ими во внеклеточное пространство про- и противовоспалительных ЦК.

Ранее было показано, что в процессе нарушения репаративного остеогенеза значительное влияние играют нарушения морфофункционального состояния периостальных источников остеорепарации и гибель остеоцитов на значительном удалении от линии перелома [20]. Известно, что в процессах физиологической регенерации костной ткани значительную роль играют остеоциты — костные макрофаги. Эти клетки элиминируют (лизуют) бесклеточные остеоны и создают условия для формирования на их месте новых остеонов остеобластными клетками. Трансплантируемые МСК, инициируя неспецифическую иммунную реакцию, активируют в области трансплантации пролиферативную фазу воспаления, тем самым оказывают иммунорегуляторное воздействие, направленное на создание условий для возобновления целостности костной ткани. Это воздействие связано с процессами клеточной пролиферации и последующего дифференцирования предшественников остеокластов, клеточных источников остеорепарации и собственно самих трансплантированных МСК.

То есть нормальное протекание остеорепарации является комплексным и тщательным образом настроенным процессом, который регулируется и цитокинами, и факторами роста, и межклеточными и клеточно-матриксными взаимодействиями. Все вышеописанные функционально-кооперативные взаимодействия МСК с иммунокомпетентными клеточными популяциями вписываются в общую концепцию остеоиммунитета, находятся под контролем остеоиммунной системы организма человека и четко регулируются ею.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Aaron J. Bone versus immune system / J.Aaron, Y.Choi // *Nature*. — 2000. — Vol. 408. — P. 535-536.
2. De Vernejoul M.C. Cellules osseuses et remodelage osseux / M.C.De Vernejoul, P.J.Marie // *Madadies métaboliques osseuses de l'adulte*. — Paris : Flammarion, 1996. — P. 3-16.
3. Effects of  $\alpha/\beta$ -androstenediol immune regulating hormones on bone remodeling and apoptosis in osteoblasts / N.H.Urban, B.Chamberlin, S.Ramage [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 2008. — P. 1-7. — Режим доступа до журн.: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.04.005>.
4. Minguell J.J. Mesenchymal stem cells / J.J.Minguell, A.Erices, P.Conget // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. — 2001. — Vol. 226. — P. 507-520.
5. Rauner M. Osteoimmunology / M.Rauner, W.Sipos, P.Pietschmann // *Int. Arch. Allergy Immunol.* — 2007. — Vol. 143. — P. 31-48.
6. Rho J. Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems / J.Rho, M.Takami, Y.Choi // *Mol. Cells*. — 2004. — Vol. 17. — P. 1-9.
7. Takayanagi H. Cross-talk between immune and skeletal systems / H.Takayanagi // *Nippon. Rinsho*. — 2002. — Vol. 60. — P. 2287-2295.
8. Возможности применения культивированных мезенхимальных стволовых клеток в травматологии и ортопедии / В.К.Гринь, Д.А.Зубов, А.Г.Попандопуло, В.М.Оксимец // *Трансплантология*. — 2007. — Т.9. — №1. — С. 55-59.
9. Зубов Д.А. Функционально-фенотипическая характеристика культивированных некоммитированных и коммитированных по остеогенному пути мезенхимальных стволовых клеток / Д.А.Зубов // *Травма*. — 2008. — Т.9. — №3. — С. 297-303.
10. Зубов Д.А. Функционально-фенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток человека / Д.А.Зубов // *Имунологія та алергологія*. — 2008. — №2. — С. 67-72.
11. Зубов Д.А. Цитокиновая иммунорегуляция репаративной регенерации костной ткани культивированными мезенхимальными стволовыми клетками / Д.А.Зубов, В.М.Оксимец // *Травма*. — 2008. — Т.9. — №2. — С. 145-153.
12. Зубов Д.О. Имунорегуляторна роль мезенхімальних стовбурових клітин в остеорепаративному процесі / Д.О.Зубов // *Фізіол. журн.* — 2008. — Т.54. — №4. — С. 30-36.
13. Иммунологические подходы в исследованиях дифференцировки клеток кроветворной и соединительной тканей / Н.Г.Хрущов, Т.В.Мичурина, Т.В.Васильева [и др.]. — М., 1984. — С. 166-189.
14. Индуктивные свойства носителей мезенхимальных стволовых клеток / В.Г.Климовицкий, В.К.Гринь, И.В.Василенко [и др.] // *Травма*. — 2007. — Т.8. — №3. — С. 243-247.
15. К вопросу об обосновании применения культивированных фетальных фибробластов человека в комплексном лечении хронических мезенхимальных дефектов / А.Г.Попандопуло, О.М.Корчак, О.А.Трунова, Д.А.Зубов, И.А.Разенкова // *Архив*



- клинической и экспериментальной медицины. — 2004. — Т.13. — №1-2. — С. 55-61.
16. Корж А.А. Репаративная регенерация кости / А.А.Корж, А.М.Белоус, Е.Я.Панков; АМН СССР. — М.: Медицина, 1972. — 232 с.
  17. Оптимизация репаративного остеогенеза трансплантацией стромальных клеток костного мозга / В.Г.Гололобов, А.К.Дулаев, Р.В.Деев [и др.] // Клеточная трансплантология. — 2004. — №1. — С. 15-16.
  18. Трансплантация аутологичных стромальных стволовых клеток как метод восстановления клеточных источников репарации (пилотные исследования) / В.Н.Казаков, В.Г.Климовицкий, В.К.Гринь [и др.] // Травма. — 2006. — Т.7. — №3. — С. 368-377.
  19. Трансплантация остеогенных клеток в ортопедии и травматологии / В.Н.Казаков, В.Г.Климовицкий, В.К.Гринь [и др.] // Журнал академії медичних наук України. — Т.12. — №2. — 2006. — С. 229-241.
  20. Влияние механизма травмы на состояние периостальных источников остеорепаляции / В.Г.Климовицкий, В.М.Оксимец, В.Ю.Черныш, А.Г.Попандопуло, А.В.Оберемко // Травма. — 2008. — Т.9. — №4. — С. 390-395.

**В.М.Оксимець. Роль мезенхімальних стромальних клітин в остеοімунних процесах. Донецьк, Україна.**

**Ключові слова:** остеοімунітет, мезенхімальні стовбурові клітини, остеорепалятивний процес, остеοгенна індукція, лужна фосфатаза, клітинний фенотип, CD-маркери, цитокіни.

*У статті наведені результати функціонально-фенотипових досліджень культивованих ліній мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку людини — некомітованих та комітованих за остеοгенним шляхом. Отримані дані узагальнено в рамках концепції про остеοімунітет. У статті розглядаються можливі шляхи активації остеорепаляції та представлена остеοімунна концепція відновлення порушених остеорепалятивних процесів трансплантованими аутологічними мезенхімальними стовбуровими клітинами у травмаатологічних пацієнтів.*

**V.M.Oksimets. The role of mesenchymal stromal cells in osteoimmunity process. Donetsk, Ukraine.**

**Key words:** osteoimmunity, mesenchymal stem cells, osteoreparation, osteogenic induction, alkaline phosphatase, cell phenotype, CD-cluster, cytokines.

*In the article the results of functional and phenotypic studies on cultured human bone marrow derived mesenchymal stem cell lineages — uncommitted and osteogenic committed — are considered. The experimental data have been summarized according to the osteoimmunity concept. In the article, the probable activating pathways of osteoreparation are discussed and the osteoimmune concept linked with a renewal of altered osteoreparative processes by transplanted autologous mesenchymal stem cells in trauma patients has been proposed.*

Надійшла до редакції 11.11.2010 р.