УДК 602. 9:611.018:636:612.017.12

Імунологічні показники крові тварин-реципієнтів

під впливом алогенних стовбурових клітин

Анотація. *Проведені експериментальні дослідження свідчать, що алогенні мезенхімальні стовбурові клітини кроля після введення в кров викликають імуносупресивну дію на лейкоцити та різні субпопуляції лімфоцитів в організмі тварин-реципієнтів.*
Ключові слова: *мезенхімальні стовбурові клітини, кістковий мозок, тварини-реципієнти, імунокомпетентні клітини, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, О-клітини, NK-клітини.*

Аннотация. *Проведенные экспериментальные исследования подтверждают, что алогенные мезенхимальные стволовые клетки кролика после введения в кровь производят иммуносупресивное действие на лейкоциты и разные субпопуляции лимфоцитов в организме животных-реципиентов.*
Ключевые слова: *мезенхимальные стволовые клетки, костный мозг, животные-реципиенты, иммунокомпетентные клетки, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, О-клетки, NK-клетки.*

Immunological parameters of the blood of animals-recipients under influence of allogeneic stem cells.
MYKOLA O. MALYUK (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine).
Abstrakt. *Experimental studies indicate, that allogeneic mesenchymal stem cells after administration to rabbits blood cause immunosuppressive effects on different subpopulations of lymphocytes.*
Key words: *mesenchymal stem cells, bone marrow, animals-recipients immunocompetent cells, T-cells, B-cells, O-cells, NK-cells.*

М. МАЛЮК, *канд. вет.наук*
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Існування в кістковому мозку стовбурових клітин строми, які утворюють у культурі колонії фібробластоподібних клітин, було вперше описано А. Фріденштейном і співавторами. Вони отримали назву «колонієутворюючі одиниці фібробластів» (КУО-ф). Стовбурова природа КУО-ф (здатність до самовідновлення і диференціювання в різні мезенхімальні і немезенхімальні клітинні елементи) була продемонстрована багаточисельними дослідженнями [10, 13]. У зв'язку із здатністю до самовідновлення і диференціювання в остеоцити, адипоцити, хондроцити ці структури дістали

ВЕТЕРИНАРІЯ ВЕТЕРИНАРІЯ ВЕТЕРИНАРІЯ

назву «мезенхімальні стовбурові клітини» (МСК) або «мезенхімальні клітини-попередниці» (МКП) [6,7]. Останнім часом в літературі найчастіше використовують термін «мезенхімальні стовбурові клітини». Незалежно від використовуваної термінології, ці клітини мають добре виражені адгезивні властивості, а при культивуванні in vitro утворюють колонії веретеноподібних клітин, які за морфологією подібні до фібробластів.

Окрім дослідження біологічних властивостей стовбурових клітин, в останні роки увагу наукової спільноти привертає можливість застосування їх із терапевтичною метою. Зокрема, вже застосовують МСК для підтримки кровотворення під час котрансплантації із гемопоетичними стовбуровими клітинами (ГСК), заміщення і відновлення функції пошкоджених негемопоетичних тканин (кістки, хряща, сухожилків, м'язів, нервової тканини, печінки тощо), пригнічення імунних конфліктів при алогенній трансплантації та аутоімунних процесах [3, 9, 12,15].

Водночас, у доступній літературі недостатньо даних щодо шляхів чи механізмів впливу МСК на імунну систему тварин.

З огляду на це, вивчення імунологічних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин, введених в організм тварин-реципієнтів, є досить актуальним і своєчасним завданням для розкриття імунорегулюючих функцій цих клітин.

Мета дослідження – дослідити зміни абсолютної кількості лейкоцитів та окремих субпопуляцій лімфоцитів у крові тварин-реципієнтів після введення їм алогенних мезенхімальних стовбурових клітин.

Мезенхімальні стовбурові клітини одержували з аспірату кісткового мозку кроля. При цьому, аспірат кісткового мозку розводили фосфатно-буферним розчином, нашаровували на попередньо внесений у стерильні пробірки розчин із градієнтом щільності =1,072 та центрифугували протягом 25 хв при відцентровій силі 300 g [2]. Одержані 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 (ФСБ) і вводили кролям у яремну вену у дозі $6,7x10^9$ 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 одержували 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:

$$X = a \times 20/100 \times b,$$

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 виділяли шляхом центрифугування проб стабілізованої гепарином крові у фікол-тріомбрастовому градієнті щільності за методом Boyum A. [5].

Визначення кількості Т-лімфоцитів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана проводили за методикою, запропонованою Jondal M. et al. [11].

Встановлення кількості В-лімфоцитів методом розеткоутворення з еритроцитами барана, обробленими антитілами та комплементом, проводили за методикою, запропонованою Bianco C. et al. [4].

Результати досліджень. Під час визначення загальної кількості лейкоцитів та окремих субпопуляцій лімфоцитів у крові кролів після введення у їх кров алогенних МСК, нами було достовірно встановлено, що введені клітини мають виражену імуносупресивну властивість (табл. 1, рис. 1).

Як видно із даних, наведених в таблиці, загальна кількість лейкоцитів і окремих субпопуляцій лімфоцитів у крові тварин, яким вводили МСК, протягом усього періоду досліджень мала своєрідну динаміку.

Так, у період з 3-ї до 23-ї доби після введення стовбурових клітин абсолютна кількість лейкоцитів була достовірно нижчою відповідно на 54-32 % проти вихідного стану.

Зміни вмісту лейкоцитів і окремих субпопуляцій лімфоцитів у крові кролів при введенні алогенних мезенхімальних стовбурових клітин

Показники	Вихідний стан	3 доба	7 доба	23 доба
Лейкоцити Г/л	7,55±0,92	4,36±0,25*	4,63±0,31	5,17±0,15**
Лімфоцити Г/л	6,67± 0,61	3,71±0,34*	3,92±0,15*	4,1± 0,2*
Т-лімфоцити Г/л	1,33±0,26	0,71±0,13	0,57±0,05*	0,76±0,04
В-лімфоцити Г/л	0,97±0,17	0,53±0,05*	0,45±0,05*	0,52±0,02*
О-лімфоцити Г/л	4,37±0,21	2,47±0,39***	2,9±0,17***	2,86±0,15***

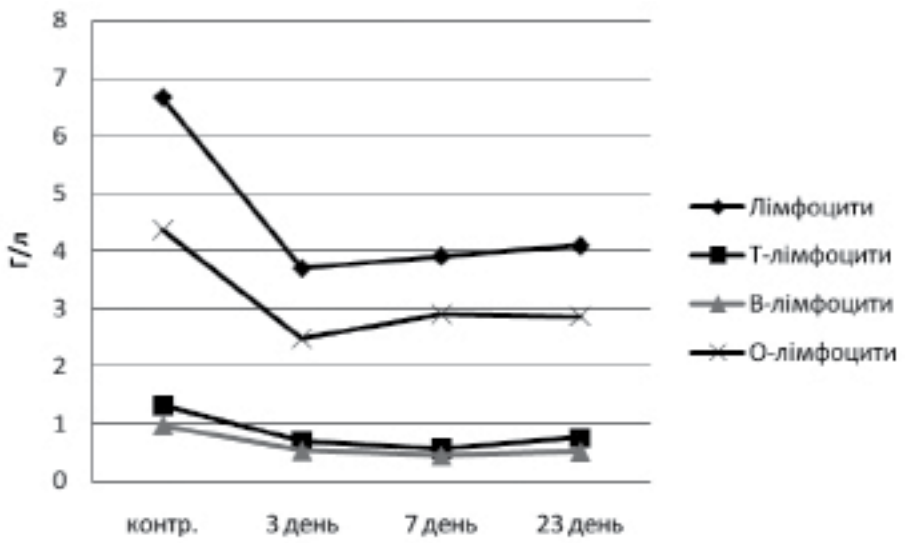
Примітка: * $p < 0,05$;** $p < 0,01$; ***$p < 0,001$

Загальна кількість лімфоцитів також була достовірно нижчою протягом періоду дослідження після введення МСК із 3-ї по 23-ю добу на 56 – 62 %.

Кількість Т-лімфоцитів достовірно знижувалась після введення стовбурових клітин з 3-ї до 23-ї доби досліду на 53 та 57% відповідно. Причому, найнижчий рівень їх спостерігався на 7-у добу і становив лише 43% від вихідного стану.

Очевидно, зменшення кількості Т-лімфоцитів відбувається під впливом відповідних медіаторів, синтезованих мезенхімальними стовбуровими клітинами, простагландинів та інтерлейкінів, які, як відомо, спричиняють супресію імунокомпетентних клітин. З літературних джерел відомо, що в ролі медіаторів МСК, які супресують синтез Т-лімфоцитів, виступають мембранний білок PD1 (programmed death 1), TGF-b (transforming growth factor-b) і HGF (hepatocyte growth factor). Окрім того, постійним продуктом секреції МСК є простагландин Е2 (PGE2), який також інгібує проліферацію Т-лімфоцитів. Інший шлях обмеження Т-клітинної відповіді на дію антигена реалізується на етапі ІЛ-2 залежної активації Т-клітин, оскільки в присутності МСК на поверхні Т-лімфоцитів експресія рецепторів до даного цитокіну знижується [3, 9, 14].

Окрім цього, МСК можуть брати участь в регуляції диференціювання Т-клітин, переважно в напрямі CD4, CD25 (Т-регуляторів), і тим самим опосередковано впливати на регуляцію інших популяцій лімфоцитів. У результаті стимуляції клону Т-регуляторів відбувається супресія проліферації ефекторних клітин (цитотоксичних Т-лімфоцитів, натуральних кілерів), а також обмеження диференціації дендритних клітин [12].



Загальний вміст у крові кролів окремих субпопуляцій лімфоцитів після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин

Як свідчать результати проведених досліджень, наведених в табл. та на рисунку, МСК також впливають і на В-клітинну імунну відповідь.

Нами встановлено достовірне зниження вмісту цих клітин на 3, 7 і 23-ю добу після введення у кров'яне русло МСК. Як відомо, до зниження вмісту цієї субпопуляції лімфоцитів приводить активін А, експресований МСК, який обмежує проліферацію, диференціювання і хемотаксис В-лімфоцитів [1, 8].

Динаміка зміни кількості Т-лімфоцитів протягом усього періоду досліджень (3 -23 доба) співпадає із динамікою змін кількості В-лімфоцитів.

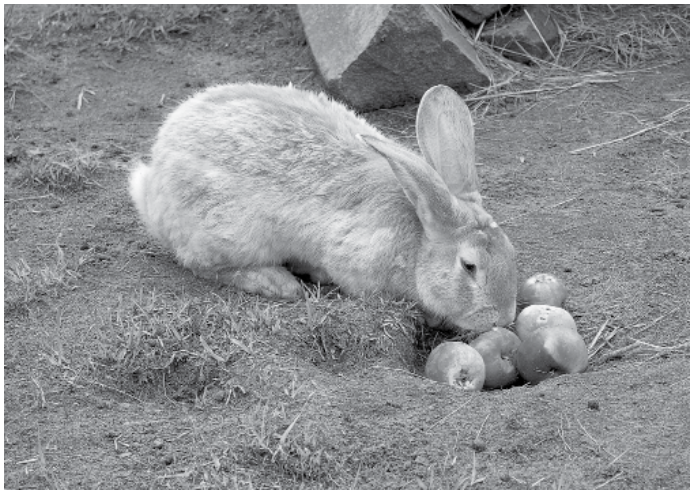
Кількість О-лімфоцитів також достовірно зменшувалась упродовж усього періоду досліджень порівняно з вихідним станом.

Відомо, що до О-лімфоцитів відносять NK-клітини та К-клітини, а також клітини, які не несуть на плазматичній мембрані рецептори Т і В-лімфоцитів. Вплив МСК на популяцію О-лімфоцитів аналогічний з їх дією на Т-клітини. Напевно, механізм такого впливу МСК, як і у випадку із Т-лімфоцитами, пов'язаний із продукцією відповідних медіаторів (TGF , PGE2), які зумовлдюють супресію популяції О-лімфоцитів і, особливо, NK-клітин, а також синтезом МСК інтерлейкінів (ІЛ-2, ІЛ-15), які також інгібують популяцію цих клітин [15].

Динаміка зміни кількості О-лімфоцитів подібна до динаміки зміни загальної кількості лейкоцитів у крові. Це свідчить про супресивний вплив МСК на різні види клітин лімфоцитарного ряду.

Висновок

Під впливом алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, введених кролям у кровоносне русло, виникає достовірне зниження загальної кількості лейкоцитів у крові цих тварин, розвивається супресивний вплив МСК на різні субпопуляції клітин лімфоцитарного ряду.

ЛІТЕРАТУРА

1. ***Владимирская Е.Б.*** *Механизмы кроветворения и лейкемогенеза.– М.: Династия, 2007.– 152с.*
2. ***Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Сушко М.І.*** *Патент України на корисну модель №46600, МПК (2009) А61К35/28. Спосіб отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною властивістю.– №и 2009 07829. Заявл. 24.07.2009. Опубл. 25.12.2009. Бюл. №24.*
3. ***Aggarwal S.*** *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood.– 2005.– Vol. 105.– P. 1815–1822.*
4. ***Bianco C.*** *Population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complex // J. Exp. Med.– 1970.– Vol. 134, №4.– P. 702–720.*
5. ***Boyum A.*** *Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes // Tissue antigens.– 1974.– №4.– P. 269–274.*
6. ***Caplan A.I.*** *The mesengenic process // Clin. Plast. Surg.– 1994.– Vol. 21.– P. 429–435.*
7. ***Conget P.A.*** *Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // J. Cell Physiol.– 1999.– Vol. 181.– P. 67–73.*
8. ***Corcione A.*** *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions // Blood.– 2006.– Vol. 107(1) .– P. 367–372.*
9. ***Di Nicola M.*** *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli // Blood.– 2002.– Vol. 99.– P. 3838–3843.*
10. ***Friedenstein A.J.*** *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method // Exp. Hematol.– 1974.– Vol. 2(2).– P. 83–92.*
11. ***Jondal M.*** *Surface marker son human T and B lymhocytes: A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes withs heep blood cells // J. exp. Med.– 1972.– Vol. 136, №2.– P. 207–215.*
12. ***Maccario R.*** *Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype // Haematologica.– 2005.– Vol. 90(4).– P. 516–525.*
13. ***Minguell J.J.*** *Mesenchymal stem cells // Exp. Biol. Med.– 2001.– Vol. 226.– P. 507–520.*
14. ***Rasmusson I.*** *Mesenchimal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantgens by different mechanisms // Experimental Cell Res.– 2005.– Vol. 305.– P. 33–41.*
15. ***Spaggiari G.M.*** *Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation // Blood.– 2006.– Vol. 107(4).– P. 1484–1490*