ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

11 • 2008

МЕДИЦИНА

УДК 611.013.68:616.08

© 2008

Л. М. Лазаренко, Л. Т. Рачкова, О. М. Демченко, О. О. Байдик,
член-кореспондент НАН України **М. Я. Співак**

Продукція цитокінів клітинами кордової крові та імуномодулювальні властивості плазми кордової крові

Cord blood cells in vitro spontaneously produce cytokines of the Th1type, interferon-γ and interleukin-2, as well as interferon-α and tumor necrosis factor-α which are implicated into the regulation of the production of cytokines of the Th1type. As a response to the adequate induction, the production of interferon, interleukin-2, and tumor necrosis factor-α was not increased, which testifies to a decrease of the cellular functional reserve of the cells producing these cytokines. Immune regulative cytokines are found in the plasma of cord blood that increases the functional activity of cells of the phagocytes system in vitro.

Фундаментальні дослідження біологічних властивостей мезенхімних стовбурних клітин, проведені впродовж останніх 45 років, лягли в основу успішного використання в клінічній практиці препаратів, створених на їх основі, у випадках, коли традиційні способи лікування мали низьку терапевтичну ефективність. Мезенхімні стовбурні клітини, основним джерелом яких є кістковий мозок і кордова кров (КК), характеризуються широким диференціювальним потенціалом, імунорезистентністю та мають імуномодулювальні властивості. Необхідно зазначити, що перевагу віддають мезенхімним стовбурним клітинам КК внаслідок їх меншої імунологічної реактивності [1–3]. Встановлено, що мезенхімні стовбурні клітини КК за певних умов здатні диференціюватись в усі клітинні елементи крові, у тому числі в імунокомпетентні — фенотипні зрілі Т- і В-лімфоцити, які розпізнають антигени, мають цитотоксичну активність та продукують цілу низку імунорегуляторних цитокінів. Імовірно, зміна цитокінового профілю організму є одним із найважливіших механізмів імуномодулювальної дії клітин КК. З іншого боку, деякі цитокіни, зокрема ІЛ-4, ІЛ-3, ІЛ-5, ІЛ-13, ГМ-КСФ, Г-КСФ, безпосередньо продукуються клітинами КК [4–6], що може впливати на їх імунорезистентність. Однак на сьогодні залишається недостатньо вивченою продукція цитокінів Th1-типу — ІФН-γ і ІЛ-2, а також фактора некрозу пухлин-α (ФНПα), які, як відомо [7], відіграють важливу роль у розвитку реакції "трансплантат проти хазяїна". Також не досліджено чимало аспектів стосовно імуномодулювальної активності плазми КК. У зв'язку з цим нами поставлено за мету встановити здатність клітин КК до продукції

імунорегуляторних цитокінів — ІФН, ІЛ-2 і ФНПα, а також визначити вміст цих цитокінів у плазмі КК та дослідити її імуномодулювальні властивості.

Для досліджень брали нативну КК та її плазму (24 зразки). Поверхневі антигени лімфоцитів КК визначали за допомогою методу прямої імунофлуоресценції. У роботі використовували моноклональні антитіла до CD3+, CD4+, CD8+, CD34+ та CD19+ антигенів (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України). Підрахунок лімфоцитів, а також аналіз результатів проводили на цитофлуориметрі FACStar^{Plus} ("Becton-Dickinson", США). У культурі клітин КК вивчали спонтанну та індуковану продукцію ІФН-γ, ІФН-α, ІЛ-2 та ФНПα як описано в [8]. Для індукції ІФН-γ та ІЛ-2 використовували фітогемаглютинін-Р (ФГА; "Difco", США), ІФН-α — ридостин ("Вектор-Фарм", Росія), а ФНПα — ліпополісахарид *Escherichia coli* 026:B6 L-2654 ("Sigma", США). Концентрацію цитокінів досліджували імуноферментним методом за допомогою відповідних тест-систем (ООО Протеїновий комплекс, Санкт-Петербург, Росія). При дослідженні імуномодулювальних властивостей плазми КК застосовували експериментальну модель інтактних безпородних білих мишей масою 18–20 г. Визначали вплив плазми КК in vitro на функціональну активність клітин фагоцитарної системи — макрофагів (МФ) черевного ексудату та природних кілерних клітин (ПКК) селезінки. Активність МФ оцінювали згідно з загальноприйнятими методами дослідження поглинальної активності та киснезалежної бактерицидності [8]. При дослідженні поглинальної активності визначали показник фагоцитозу (ПФ), підраховуючи у полі зору мікроскопа кількість фагоцитів, які містили латекс (%), та фагоцитарне число (ФЧ) — середню кількість часточок латексу, які поглинались (ум. од.). Киснезалежну бактерицидну активність фагоцитів досліджували в спонтанному та стимульованому пірогеналом тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) цитохімічним методом. У полі зору мікроскопа вираховували відсоток клітин, що містили темно-сині гранули диформазану на 100 підрахованих фагоцитів. Функціональний резерв (ФР) визначали за різницею між показниками стимульованого та спонтанного НСТ-тесту (%). Активність ПКК досліджували за допомогою колориметричного методу [9]. Визначали індекс природної кілерної активності (ПКА), який вираховували за формулою $(T_д - T_к/T_д)\cdot 100(\%)$, де $T_д$, $T_к$ — оптична густина у зразках у досліді та контролі відповідно. Отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою методу варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента. З метою оцінки окремих показників використовували їх середнє арифметичне значення $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$).

Результати дослідження фенотипного складу лейкоцитів показали, що серед клітин КК виявлялись CD34+ клітини ($(1{,}8 \pm 0{,}6)\%$), CD3+ Т-лімфоцити ($(56{,}7 \pm 5{,}6)\%$), CD4+ Т-хелпери/індуктори ($(37{,}3 \pm 8{,}1)\%$), CD8+ Т-супресори/цитотоксичні ($(29{,}5 \pm 6{,}5)\%$) та CD19+ В-лімфоцити ($(13{,}7 \pm 4{,}2)\%$), які здатні продукувати широкий спектр імунорегуляторних цитокінів. Встановлено, що клітини КК мали інтерфероногенну активність, а також продукували ІЛ-2 та прозапальний цитокін — ФНПα. Так, *in vitro* клітини КК спонтанно продукували ІФН-α та ІФН-γ у концентрації ($28{,}19 \pm 1{,}90$) та ($33{,}70 \pm 5{,}10$) пг/мл відповідно (рис. 1). Зауважимо, що на відміну від клітин периферичної крові новонароджених [10] клітини КК *in vitro* продукували ІФН-γ на рівні ІФН-α, що, імовірно, пов'язано з більш високою кількістю серед клітин КК Т-хелперів/індукторів Th1-типу. У відповідь на адекватну індукцію продукція ІФН-α та ІФН-γ істотно не змінювалась. Активовані ридостином клітини КК продукували ІФН-α у концентрації ($29{,}07 \pm 2{,}21$) пг/мл ($p > 0{,}05$). Спостерігалось незначне підвищення продукції ІФН-γ у відповідь на індукцію ФГА ($(43{,}30 \pm 4{,}91)$ пг/мл; $p > 0{,}05$), але різниця не була вірогідною. Звертає на себе увагу те, що у 30,0% випадків про-

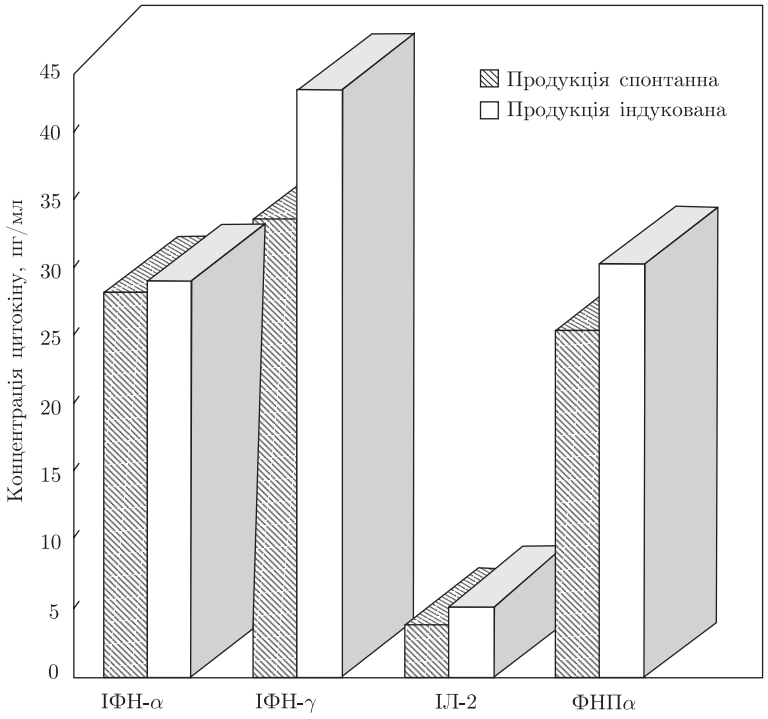

Рис. 1. Спонтанна та індукована продукція цитокінів клітинами кордової крові in vitro. Продукцію ІФН-α та ФНПα визначали через 24 год культивування, ІФН-γ та ІЛ-2 — через 48 год

дукція ІФН-γ ФГА-активованими клітинами КК виявилась удвічі нижчою, ніж спонтанна ((27,85 ± 2,70) та (55,80 ± 1,90) пг/мл відповідно; $p < 0{,}05$). Встановлено пряму кореляційну залежність між спонтанною продукцією ІФН-γ та ІФН-α ($R = 0{,}655$; $p < 0{,}05$), тобто при низькому рівні продукції ІФН II типу клітини КК мали більш низьку здатність до продукції ІФН I типу і навпаки. Однак була відсутньою кореляція між індукованою продукцією ІФН-α та ІФН-γ ($R = 0{,}185$; $p > 0{,}05$). Клітини КК in vitro спонтанно продукували ІЛ-2 у концентрації (3,98 ± 0,99) пг/мл (див. рис. 1). Продукція цього цитокіну у відповідь на індукцію ФГА вірогідно не підвищувалась ((5,58 ± 2,10) пг/мл; $p < 0{,}05$). У 20,0% випадків клітини КК продукували ІЛ-2 спонтанно на вищому рівні, ніж у відповідь на індукцію ФГА ((7,78 ± 1,70) та (3,10 ± 0,81) пг/мл відповідно; $p < 0{,}05$). Саме в цих зразках виявлено і порушення здатності клітин КК до продукції ІФН-γ у відповідь на індукцію ФГА. Залежність між продукцією ІФН-γ та ІЛ-2 підтверджувалась наявністю прямого кореляційного зв'язку ($R = 0{,}866$; $p < 0{,}05$). Клітини КК спонтанно продукували ФНПα у концентрації (25,60 ± 3,40) пг/мл (див. рис. 1), але вірогідно підвищення продукції цього цитокіну у відповідь на індукцію ЛПС також не спостерігалось ((30,42 ± 1,10) пг/мл; $p > 0{,}05$).

Імунорегуляторні цитокіни виявлялись у плазмі КК: концентрація ІФН-γ дорівнювала (59,80 ± 6,70) пг/мл; ІФН-α — (36,66 ± 9,10) пг/мл; ІЛ-2 — (2,70 ± 0,90) пг/мл; ФНПα — (37,93 ± 3,4) пг/мл. Показано, що плазма КК in vitro справляла імуномодулювальну дію на ефекторні клітини імунної системи. Під її впливом активувалась киснезалежна бактерицидність МФ черевного ексудату мишей, що виявлялося в істотному підвищенні показників спонтанного НСТ-тесту (табл. 1). Разом з тим кількість НСТ-позитивних МФ у стимульованому НСТ-тесті зростала незначно, а ФР зберігався на рівні контролю. Також частково підвищувалась поглинальна активність МФ: зростав ПФ на тлі незмінного ФЧ (див. табл. 1).

Таблиця 1. Вплив плазми кордової крові на функціональну активність макрофагів in vitro

Макрофаги	Функціональна активність макрофагів				
	ПФ, %	ФЧ, ум. од.	НСТ спон., %	НСТ стим., %	ФР, %
Не оброблені плазмою КК (контроль)	$31{,}3 \pm 2{,}3$	$3{,}2 \pm 0{,}9$	$10{,}6 \pm 3{,}3$	$23{,}5 \pm 3{,}2$	$12{,}9 \pm 1{,}1$
Оброблені плазмою КК	$49{,}6 \pm 3{,}1^*$	$4{,}3 \pm 0{,}5$	$62{,}5 \pm 5{,}2^*$	$68{,}9 \pm 6{,}1$	$6{,}4 \pm 2{,}5$

$^*p < 0{,}05$ відносно показників контролю.

Однак під впливом плазми КК in vitro не змінювалась цитотоксична активність ПКК селезінки відносно клітин лінії L-929. Індекс ПКА спленоцитів, оброблених плазмою КК, зберігався на рівні показників контролю ($(26{,}7 \pm 3{,}4)\%$; у контролі $(27{,}6 \pm 2{,}7)\%$, $p > 0{,}05$).

Таким чином, клітини КК in vitro продукували ІФН-α та ІФН-γ, ІЛ-2, а також ФНПα, а плазма КК, в якій виявлялись ці цитокіни, справляла імуномодулювальний вплив на клітини фагоцитарної системи in vitro. Отримані нами дані показали, що у відповідь на адекватну індукцію здатність клітин КК до продукції цитокінів підвищувалась незначно, що свідчить про їх слабкий функціональний резерв. У 30,0 та 20,0% випадків відповідно продукція ІФН-γ та ІЛ-2 ФГА-активованими клітинами КК виявилась удвічі нижчою, ніж спонтанна. Тобто встановлено істотне порушення здатності клітин КК до продукції цих цитокінів in vitro у відповідь на адекватну індукцію. Нещодавно показано [6], що активовані клітини КК in vitro продукували ІЛ-2 на рівні клітин периферичної крові новонароджених, а ІФН-γ — на нижчому. Водночас в активованих клітинах КК виявлено низький рівень транскрипційного фактора NF-kB, який залучається в регуляцію експресії генів цитокінів, порівняно з клітинами периферичної крові новонароджених [6]. Імовірно, після трансплантації клітини КК будуть продукувати імунорегуляторні цитокіни, зокрема ІФН-γ і ІЛ-2, а також ФНПα і ІФН-α, які залучаються в регуляцію продукції цитокінів Th1-типу, на низькому рівні. А це має важливе значення для зниження імовірності розвитку реакції "трансплантат проти хазяїна", що сприяє формуванню адекватних умов для виживання мезенхімних стовбурних клітин КК в організмі реципієнта та їх диференціювання у його фенотипні зрілі клітини. У зв'язку з цим дослідження продукції імунорегуляторних цитокінів клітинами КК *in vitro* у відповідь на адекватну індукцію, а також вмісту цитокінів у плазмі КК доцільно використовувати як додатковий маркер оцінки терапевтичної ефективності препаратів, створених на основі КК.

1. *Кухарчук А. Л., Радченко В. В., Сирман В. М.* Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. – Киев: КРС-Медицинские технологии, 2004. – 505 с.
2. *Гулевський О. К., Грищенко В. І., Нікольченко А. М., Моісєєва Н. М.* Властивості і перспективи використання кордової крові в клінічній практиці // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2005. – № 5. – С. 5–14.
3. *Адбулкадыров К. М.* Клиническая гематология: Справочник. – Санкт-Петербург: Питер, 2006. – 447 с.
4. *Gur H., Krauthgamer R., Bachar-Lusting E. et al.* Immune regulatory activity of CD34+ progenitor cells: evidence for a deletion-based mechanism mediated by TNF-alpha // Blood. – 2005. – **105**, No 6. – P. 2585–2593.
5. *Huang Y. J., Sun Q. Y., Liu L. H. et al.* Kinetic study of various cytokine mRNA expression in rhesus treated with haploidentical peripheral blood stem cell transplantation // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2006. – **14**, No 3. – P. 571–576.
6. *Nitsche A., Zhan M., Claus T. et al.* Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors // BMC Immunol. – 2007. – **18**, No 8. – PMCID: PMC2018703 [PubMed – indexed for MEDLINE].
7. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология / Пер. с англ. В. И. Кандора, А. Н. Маца, Л. А. Певницкого, М. А. Серовой. – Москва: Мир, 2000. – 581 с.

8. *Современные* методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона (методические рекомендации) / Под. ред. А. Ф. Модзолевского, Н. С. Дяченко, Н. Я. Спивака. – Киев, 1994. – 18 с.
9. *Кузовкова Н. А.* Оценка активности естественных киллеров колориметрическим методом // Иммунология. – 1991. – № 4. – С. 59–61.
10. *Кравчук Б. О., Спивак Н. Я., Стинич О. А. и др.* Состояние системы интерферона при обструктивном бронхите у детей раннего возраста с синдромом гиперплазии тимуса // Соврем. педиатрия. – 2004. – № 3(4). – С. 86–89.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 20.02.2008