

Д.О. Зубов

Імунорегуляторна роль мезенхімальних стовбурових клітин в остеорепаративному процесі

Исследовали in vitro секрецию интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 и фактор некроза опухоли (ФНО- α) некоммитированными и коммитированными по остеогенному пути мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) костного мозга человека. Выявлено, что все перечисленные цитокины секретируются культивированными МСК. Впервые показана продукция ИЛ-1 β и ИЛ-2 культивированными МСК, а также гиперпродукция ИЛ-6 (до 276,5 нг/мл, $P < 0,05$) и ИЛ-8 (до 106,6 нг/мл, $P < 0,05$) остеоиндуцированными МСК. Обговаривается иммунорегуляторная роль трансплантированных аутологических клеток в процессах воспаления и собственно остеорепарации, протекающих при посттравматическом заживлении переломов.

ВСТУП

Основною функцією остеобласта є участь у фізіологічній і репаративній регенерації кісткової тканини – остеогенезі. Останній характеризується залученням і проліферацією остеопрогеніторних клітин. Джерелами, що забезпечують процеси остеогенезу, є активно проліферуючі малодиференційовані клітини-попередники. До них відносяться мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), що локалізовані в стромі кісткового мозку і позаскелетних кровотворних органах [13], остеогенні клітини внутрішнього шару періосту, клітинні елементи каналів остеонів і ендосту та периваскулярні клітини [1–3]. Ці клітини після зупинки розмноження, диференціюються у функціонуючі остеобласти/остеоцити, що відповідають за синтез і мінералізацію кісткового матриксу. Зрілі остеобласти характеризуються певними маркерами диференціації, такими, як лужна фосфатаза (ЛФ), колаген I типу, остеопонтин, трансформуючий фактор росту- β фібронектин, остеокальцин і кістковий сіалопротейн [15].

© Д.О. Зубов

Будь-який репаративний процес проходить низку класичних стадій, які є серією комплексних подій, таких як хемотаксис, мітоз, васкуляризація, синтез компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ) і його реорганізація [8]. В остеорепаративному процесі прийнято виділяти також стадію формування і реорганізації кісткового регенерату [5–7]. Контроль більшості подій, що розвиваються протягом ранового загоєння, здійснюється за допомогою розчинних медіаторів (фактори росту, цитокини – ЦК, матриксні металопротеїнази тощо), які впливають на різні клітинні типи [8–10]. При остеорепаративних процесах дія цих медіаторів направлена на МСК, остеобласти, ендотеліоцити, клітини лімфоїдного та мієлоїдного паростків, а також клітини моноцитарно-макрофагального ряду. У кістковій рані остеорепаративні процеси запускаються ушкоджувальним чинником (механічна дія, некротизація ділянок кісткової тканини), який призводить до руйнування клітинних мембран і запуску чотирьох фаз, що перекриваються, але чітко визначених: гемостазу, запалення,

проліферації та ремоделювання [5].

Відомо, що антигенний фенотип остеобластоподібних клітин, їх здатність фагоцитувати частинки різної природи та розмірів і стимулювати алогенні Т-клітини свідчить про наявність взаємодій цих клітин і клітин інших популяцій, з якими вони можуть розділяти деякі загальні імунні функції. Свою імунорегуляторну функцію остеобластоподібні клітини можуть реалізовувати через інтерлейкіни (ІЛ) – ІЛ-4, ІЛ-12, ІЛ-15, ІЛ-18 і γ -інтерферон, що експресуються ними [17]. У функціональному плані остеобласти можна віднести до фолікулярних дендритичних клітин на підставі спільності поверхневих антигенів обох популяцій [17].

Вивчення імунорегуляторної ролі кісткомозкових МСК, як потенційних активаторів і учасників фази запалення та власне остеорепаративного процесу, має важливе теоретичне і практичне значення для подальшого розуміння механізмів посттравматичного остеогенезу та оптимізації технологій трансплантації МСК. До того ж, клінічні дослідження показали, що трансплантація культивованих некомітованих МСК пацієнтам з переломами кісток нижніх кінцівок, що тривало не зростаються, виявилася вельми ефективною [4].

Метою нашого дослідження було визначення функціонального статусу некомітованих і комітованих за остеогенним шляхом МСК за допомогою вивчення кількісної продукції таких ЦК: ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8 і ФНП- α (фактор некрозу пухлин- α).

МЕТОДИКА

МСК ізолювали згідно з загальноприйнятою методикою [16] з аспірату кісткового мозку при пунктируванні груднини або гребеня клубової кістки у пацієнтів травматологічного профілю. Середня кількість аспірату становила 20 мл від одного хворого. Мононуклеарну фракцію аспірату висівали на вкриті колагеном пластикові флакони

площею 75 см² (“Corning”, США) і культивували в ростовому середовищі DMEM/F12 (“Sigma”, США) з додаванням 10%-ї ембріональної телячої сироватки (“Біолот”, Росія) і 1 нг/мл основного фактора росту фібробластів (“Sigma”, США) в CO₂-інкубаторі (“Jouan”, Франція) при 37°C в атмосфері з 5%-м CO₂. При субкультивуванні культур використовували 0,25%-й розчин трипсину і ЕДТА (“Біолот”, Росія) у співвідношенні 1:5. Таким чином отримували некомітовані МСК (І група). Остеоіндукцію ліній МСК здійснювали внесенням до вищевказаного ростового середовища остеогенної добавки: 0,1 ммоль/л дексаметазону, 10 ммоль/л β -гліцерофосфату і 50 мкг/мл аскорбінової кислоти (“Sigma”, США) та отримували комітовані за остеогенним шляхом МСК (ІІ група).

Некомітовані клітини – це первісно ізольовані недиференційовані МСК, що активно проліферують та не продукують лужну фосфатазу. Комітовані за остеогенним шляхом клітини – це спрямовано диференційовані в культурі МСК, що не проліферують та продукують лужну фосфатазу – маркерний фермент остеогенних ліній.

Дані щодо інтерлейкінової продукції були взяті з досліджень, проведених на культурах мононуклеарів периферичної крові (МНПК) здорових донорів. Мононуклеари периферичної крові – це гетерогенні популяції одноядерних клітин, що мігрують до циркуляторного русла з кісткового мозку. Вони включають як субстрат-незалежні ранні популяції гемопоетичних стовбурових клітин, так й адгерентні до пластику мало диференційовані популяції МСК [11, 12, 18].

Визначення активності ЛФ проводили цитохімічним методом із застосуванням субстрату BCIP/NBT Liquid Substrate System (“Sigma”, США) згідно з інструкцією.

Кількісне визначення ЦК у клітинних супернатантах проводили за допомогою імуноферментного методу – BD OPTIA Human ELISA (“BD Biosciences”, США).

Вимірювання проводили за оптичною щільністю одержаного розчину з використанням фотометра для багатофункціонального аналізу Synergy HT Bio-Tek Instruments і програми KC4 System (США).

Вимірювання концентрації ЦК у культурах здійснювали згідно зі схемою: некомітовані МСК – збір супернатанту проводили на 1-шу, 3-тю і 5-ту добу; комітовані за остеогенним шляхом МСК – 10-ту, 13-ту, 16-ту і 19-ту добу культивування. Кількість супернатантів за добу була по 30 одиниць.

Візуалізацію і фотодокументування культур здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Leica DMIL, робочої станції з обробки зображень Leica QWin500 Standart і відеокамери Sanyo TK-C1380 (Німеччина).

Одержані результати були виражені як середнє значення із стандартною помилкою середнього і статистично проаналізовані за допомогою критерію *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Максимальна концентрація ЦК виявлялася в супернатантах некомітованих культур, зібраних після 3 діб культивування: ІЛ-1 β – 56,21, ІЛ-2 – 14,92, ІЛ-4 – 32,56, ІЛ-6 – 112,52, ІЛ-8 – 386,11 і ФНП- α – 17,74 пг/мл (рис. 1). Концентрація ЦК у добовому супернатанті була нижчою щодо тридобового супернатанту, а кондиційоване середовище, що не зливалося з культур протягом 5 діб культивування, вже показувало зниження концентрації у всьому ЦК спектрі некомітованих МСК. Тому рівень секреції ЦК некомітованими МСК був прийнятий за базовий за даних умов культивування.

Визначення концентрації ЦК у супернатантах культур остеоіндукованих МСК проводили в тридобових зливах на 10, 13, 16 і 19-ту добу індукції (рис. 2). Вибір цих термінів був зумовлений особливостями технології остеоіндукції МСК.

Чіткої лінійної залежності в зменшенні або збільшенні секреції ЦК МСК залежно від доби культивування не спостерігалось. Проте при апроксимації та згладжуванні одержаних кривих виявилось, що в разі ІЛ-1 β , ІЛ-2 і ІЛ-4 (рис. 2, а–в) спостерігається тенденція до збільшення рівня їхньої секреції з 10-ї по 19-ї доби індукції, а для ІЛ-6, ІЛ-8 і ФНП- α – до зниження (рис. 2, г–е).

На рис. 3 наведено порівняльну діаграму середнього рівня секреції ЦК некомітованими і комітованими за остеогенним шляхом лініями МСК, а також значення концентрацій ЦК, які виміряли в клітинних культурах мононуклеарів периферичної крові здорових донорів, згідно з даними мета-аналізу [11, 12, 18].

Наведені результати свідчать про те, що вміст ІЛ-6 (101,3 пг/мл – некомітовані МСК і 276,5 пг/мл – комітовані МСК) і ІЛ-8 (261,6 пг/мл і 106,6 нг/мл відповідно) в обох групах значно вищі, ніж решти всіх зміряних ЦК і групи МН ПК. Продукція ІЛ-6 остеоіндукованими лініями в 2,7 рази більша, ніж некомітованими, і майже в 7 разів вища, ніж у культурах МН ПК здорових донорів. Але секреція ІЛ-6 некомітованими МСК також є більшою в 2,5 рази, ніж у групі МН ПК. Продукція ІЛ-8 комітованими лініями в 4 рази більша, ніж некомітованими, і майже в 6 разів вища порівняно з культурами МН ПК здорових донорів. Секреція ІЛ-8 некомітованими МСК також є більшою, ніж у групі МН ПК (в 1,5 рази).

Вміст прозапального ІЛ-1 β (рис. 3) також є вищим у комітованій групі (47,8 пг/мл). Його продукція остеоіндукованими лініями в 1,5 рази більше, ніж некомітованих (32,7 пг/мл) і в 2,7 рази, ніж у культурах МН ПК здорових донорів. Секреція ІЛ-1 β некомітованими МСК також є більшою (майже вдвічі) порівняно зі значеннями в групі МН ПК.

Щодо рівня секреції решти ЦК достовірних відмінностей не одержано. Але

концентрація протизапального ІЛ-4 є значно нижчою в супернатантах некомітованих (16,9 пг/мл) і комітованих (14,4 пг/мл) культур, ніж у групі МН ПК здорових донорів. Більш того, секреція МСК ІЛ-1 β (на відміну від ІЛ-1 α) і ІЛ-2 вперше показана в цих дослідженнях. У зарубіжній літературі дані щодо їх секреції остеобластами або МСК відсутні.

Відомо, що біологічною суттю запальної реакції, що розвивається у відповідь на

травму, є створення умов для негайної елімінації некротизованих клітин і для власне репаративних процесів. Тому, на початку першої стадії порушеної посттравматичної регенерації, всі регуляторні процеси направлені на розвиток запалення у вогнищі пошкодження. У зв'язку з тим, що швидкість репарації кістки залежить від інтенсивності деструкції пошкоджених клітин і вивільнення остеоіндуктивних факторів, то на загоєння кісткової рани

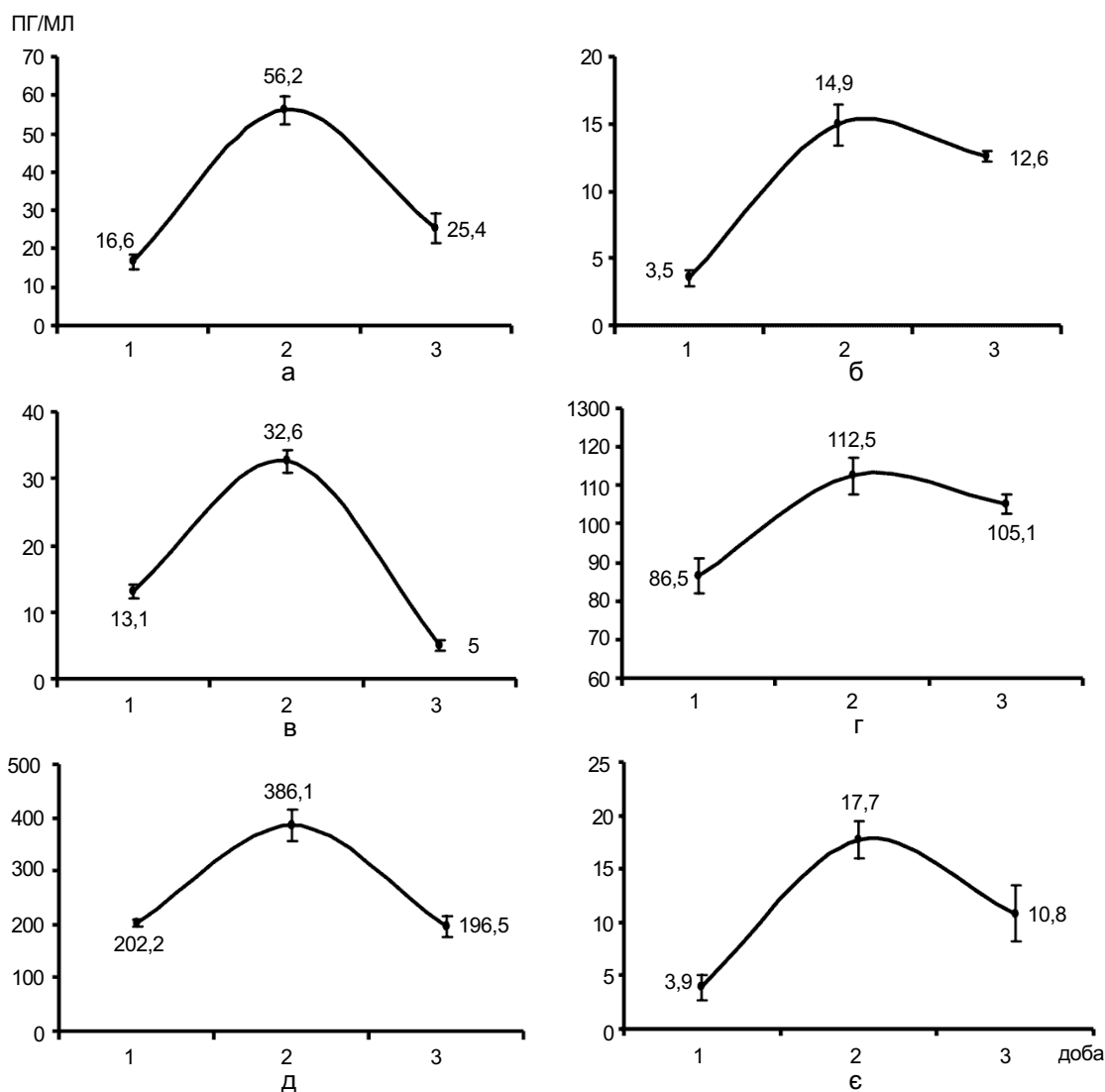


Рис. 1. Динаміка продукції цитокінів некомітованими лініями мезенхімальних стовбурових клітин залежно від доби культивування: а – інтерлейкін-1 β , б – інтерлейкін-2, в – інтерлейкін-4, г – інтерлейкін-6, д – інтерлейкін-8, є – фактор некрозу пухлин α

значний вплив має співвідношення між стимулювальними та пригнічувальними факторами, що вивільняються з пошкоджених клітин, а також синтезуються життєздатними клітинами. Протягом наступної фази, репарації, імунорегуляторні процеси направлені на створення умов для відновлення цілісності кісткової тканини, що пов'язано з процесами проліферації і наступного диференціювання клітинних джерел остеорепації [14].

Отже, узагальнюючи, можна говорити

про те, що МСК у процесі проліферації і раннього диференціювання продукують переважно прозапальні інтерлейкіни ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 і ІЛ-8, які регулюють розвиток запальних процесів у вогнищі пошкодження, залучення кісткових макрофагів (остеокластів), резорбцію некротизованих ділянок кісткової тканини. Це сприяє створенню умов для прикріплення МСК/остеобластів до життєздатної кісткової тканини і формування остеонів. Продукція МСК протизапального ІЛ-4, найімовірніше,

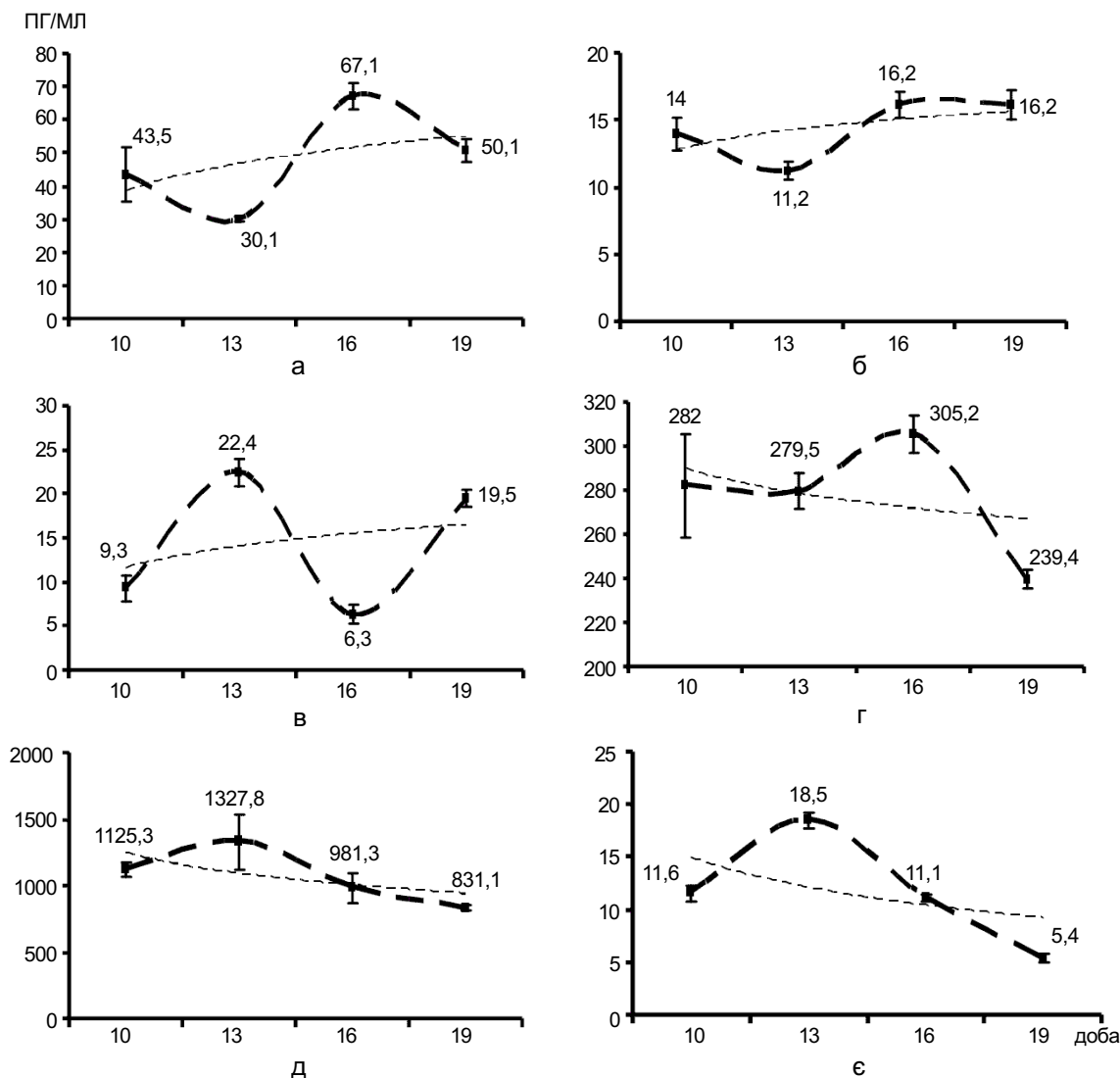


Рис. 2. Динаміка продукції цитокінів комітованими за остеогенними шляхом лініями мезенхімальних стовбурових клітин залежно від доби культивування: а – інтерлейкін-1 β , б – інтерлейкін-2, в – інтерлейкін-4, г – інтерлейкін-6, д – інтерлейкін-8, е – фактор некрозу пухлин α

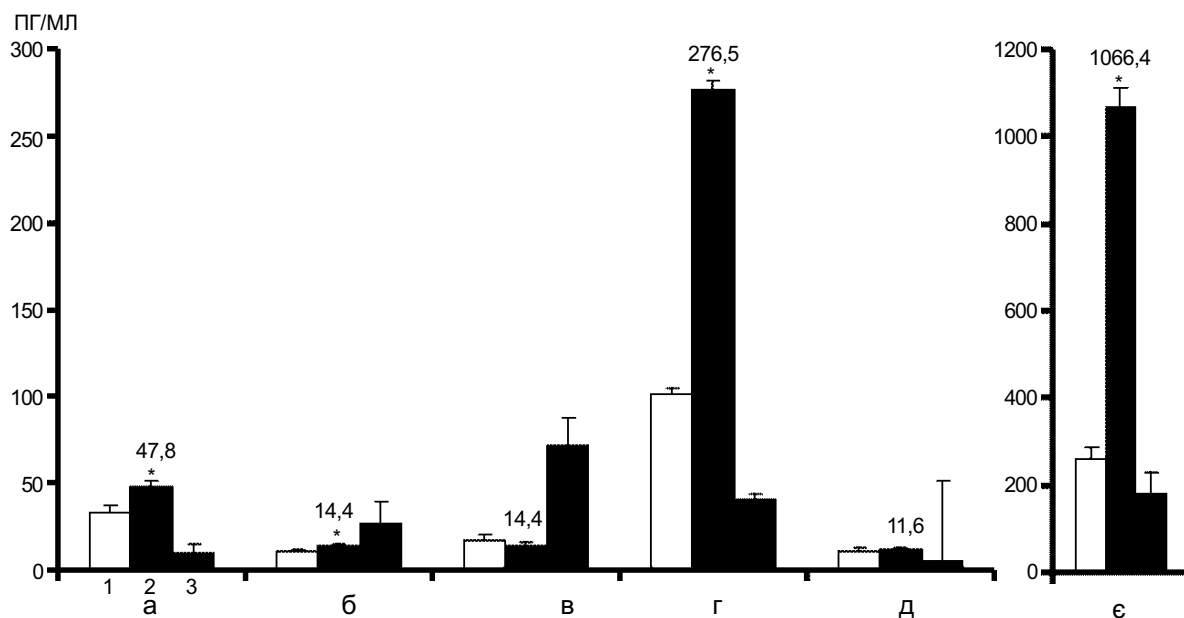


Рис. 3. Середній рівень продукції цитокінів мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК) кісткового мозку людини: 1 – некомітовані МСК, 2 – комітовані за остеогенним шляхом МСК, 3 – мононуклеари периферичної крові здорових донорів: а – інтерлейкін-1β, б – інтерлейкін-2, в – інтерлейкін-4, г – інтерлейкін-6, д – фактор некрозу пухлин α, є – інтерлейкін-8. * P < 0,05

виконує стримуючу регуляторну функцію, яка направлена на пригнічення запальних і остеорезорбувальних процесів. Співвідношення прозапальних і протизапальних ЦК на ранніх етапах диференціювання МСК зміщується в бік превалювання прозапальних. Крім участі МСК в імунорегуляції запальних процесів за допомогою секреції ФНП-α, ІЛ-1β, ІЛ-6 і ІЛ-8, ці клітини сприяють функціональній кооперації МСК/остеобластів і лімфоцитів, а за допомогою секреції ІЛ-2 і ІЛ-4 МСК активують В- і Т-лімфоцити і стимулюють проліферацію лімфоїдних і міелоїдних ліній гемопоетичних стовбурових клітин.

Таким чином, поверхнева експресія різних функціональних молекул і секреція деяких ключових імунорегуляторних ЦК досліджуваними клітинами, дають змогу розглядати культивовані МСК як ефективні активатори кісткової резорбції, запалення та імунологічних реакцій в процесі порушеної остеорепарації, особливо в тих випадках, коли останній має тенденцію до хронізації та «завмирає» в проліферативній фазі запалення.

D.A.Zubov

IMMUNOREGULATORY ROLE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN BONE REPARATION PROCESSES

Bone marrow contains mesenchymal stem cells (MSC) including osteoblast progenitor cells. When cultured under conditions promoting an osteoblastic phenotype, MSC proliferate to form colonies that produce alkaline phosphatase and, subsequently, a mature osteoblastic phenotype. Transplantation of cultured autologous MSC to patients with non-healing bone fractures gives a good result leading to complete bone fracture consolidation. The aim of the study is to determine a quantitative production of IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 and TNF-α by cultured uncommitted and committed osteogenic MSC. The results showed that the cytokine profile consisting of IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 and TNF-α is secreted by cultured MSC. The secretion of IL-1β and IL-2 by cultured MSC together with hyper production of IL-6 (up to 276,5 pg/ml, p<0,05) and IL-8 (up to 106,6 ng/ml, p<0,05) by osteoinduced MSC are firstly shown. The immunoregulatory role of transplanted autologous cells in inflammation and own bone repairation processes during post-traumatic bone fracture healing is highlighted. In conclusion, the data obtained allow examining of cultured autologous MSC as effective activators of bone resorption, inflammation and some immunological reactions in the process of altered osteoreparation.

Institute of Genetic and Regenerative Medicine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гололобов В.Г., Деев Р.В. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон / Морфология (Morphology). – 2003. – **123**, №1. – С. 9–19.
2. Илизаров Г. А., Палиенко Л. А., Шрейнер А. А., Богомяков В.С. Динамика численности костномозговых клеток, образующих колонии фибробластов в культуре, и ее связь с активностью остеогенеза при репаративной регенерации в условиях удлинения конечности // Онтогенез. – 1983. – **14**, № 6. – С. 617–623.
3. Илизаров Г.А., Швед С.И., Мальцева Л.В. О роли костного мозга в консолидации переломов // Травматология и ортопедия России. – 1994. – № 2. – С. 158–161.
4. Казаков В.Н., Климовицкий В.Г., Гринь В.К. и др. Трансплантация остеогенных клеток в ортопедии и травматологии // Журн. академії мед. наук України. – 2006. – **12**, №2. – С. 229–241.
5. Корж А.А., Белоус А.М., Панков Е.Я. Репаративная регенерация кости / АМН СССР. – М.: Медицина, 1972. – 232 с.
6. Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. – М.: Медицина, 1996. – 208 с.
7. Лиознер Л.Д., Сидорова В.Ф. Состояние процессов физиологической и репаративной регенерации // Журн. общей биологии. – 1975. – **36**, №2. – С. 237–242.
8. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M. et al. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. – In: *Molecular Biology of the Cell*. – New York: Garland Science, 2002. – P. 1065–1125.
9. Barrick B., Campbell E.J., Owen C.A. Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathological processes // Wound Repair Regen. – 1999. – **7**. – P. 410–422.
10. Cook H., Davies K.J., Harding K.G. et al. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity // J. Invest. Dermatol. – 2000. – **115**. – P. 225–233.
11. Denizota Y., Bessea A., Raherb S. et al. Interleukin-4 (IL-4), but not IL-10, regulates the synthesis of IL-6, IL-8 and leukemia inhibitory factor by human bone marrow stromal cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol. Cell Res. – 1999. – **1449**, №1. – P. 83–92.
12. De Groote D., Zangerle P.F., Gevaert Y., Fassotte M.F. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation // Cytokine. – 1992. – **4**, №3. – P. 239–248.
13. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. – 2006. – **8**, №4. – P. 315–317.
14. Frost H.M. The Biology of Fracture Healing. An overview for clinicians. Part I // Clin. Orthop. Rel. Res. – 1989. – **248**. – P. 283–293.
15. Marie P.J. Osteoblasts and bone formation. In: *Advances in organ biology: molecular and cellular biology of bone*. – Stamford, CT (USA): JAI Press, 1999. – №5B. – P. 401–427.
16. Minguell J.J., Erices A., Conget P. Mesenchymal stem cells // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2001. – **226**. – P. 507–520.
17. Ruiz C., Perez E., Garcia-Martinez O. et al. Expression of cytokines IL-4, IL-12, IL-15, IL-18, and IFN γ and modulation by different growth factors in cultured human osteoblast-like cells // J. Bone Miner. Metab. – 2007. – **25**, №5. – P. 286–292.
18. Silberer J., Ihorst G., Kopp M.V. Cytokine levels in supernatants of whole blood and mononuclear cell cultures in adults and neonates reveal significant differences with respect to interleukin-13 and interferon-gamma // Pediatr. Allergy Immunol. – 2008. – **19**, №2. – P. 140–147.

*Ін-т генет. та регенерат. медицини АМН України, Київ
zoubov77@yahoo.com*

*Матеріал надійшов до
редакції 04.02.2008*