

ПИКУС П. А.^{1,2✉}, РЫМАРЬ С. Е.^{1,2}, ШУВАЛОВА Н. С.², КОРДЮМ В. А.^{1,2}¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,

Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150, e-mail: polinaignatchenko7@gmail.com

² ДУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»,

Украина, 04114, г. Киев, ул. Вышгородская, 67

✉ polinaignatchenko7@gmail.com, (095) 497-79-93

ВЛИЯНИЕ ДОЗЫ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ (СТВОЛОВЫХ) КЛЕТОК ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОСТРОЕ ВОСПАЛЕНИЕ НА МОДЕЛИ ПЕРИТОНИТА У МЫШЕЙ

Цель. Изучить влияние дозы мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток (МСК) пуповины человека на острое воспаление на модели перитонита у мышей, индуцированного интраперитонеальным введением 3% раствора протеозного пептона. МСК пуповины человека могут быть использованы в клеточной терапии в качестве аллогенных, так как их свойства обеспечивают минимальный риск иммунного ответа при введении в организм. Воспаление, которым сопровождаются все заболевания, является основной мишенью для МСК. **Методы.** В работе использованы методы клеточной биологии. **Результаты.** Показано, что через 4 часа после введения МСК резко падает количество макрофагов в перитонеальной полости мыши. Введение 5×10^3 клеток на мышь приводит к уменьшению количества макрофагов в экссудате на 78%. Полное возвращение к норме наблюдается при введении $70-100 \times 10^3$ клеток на мышь. Параллельно с уменьшением количества макрофагов уменьшается их фагоцитарная активность, и эти изменения также зависят от дозы инъецированных МСК. **Выводы.** Показано дозозависимое снижение интенсивности острого воспаления брюшной полости у мышей при введении МСК пуповины человека. Количество макрофагов в перитонеальном экссудате снижается на 78% через 4 часа после введения 5×10^3 клеток на мышь. Полное угнетение воспаления наблюдается при введении $70-100 \times 10^3$ клеток. Угнетение воспаления сопровождается уменьшением фагоцитарной активности макрофагов, что свидетельствует об изменении их поляризации.

Ключевые слова: МСК пуповины человека, воспаление, макрофаги, фагоцитарная активность.

Мезенхимальные стромальные (стволовые) клетки (МСК) обладают уникальными свойствами. Их мультипотентные свойства,

высокая скорость пролиферации, способность к самообновлению, способность мигрировать в места повреждений, иммуномодуляторные, репаративные свойства обуславливают их высокий терапевтический потенциал и возможность использования в регенеративной медицине. Особое место среди взрослых МСК занимают клетки, которые выделяют из перинатальных тканей. Эти клетки представляют собой промежуточный тип стволовых клеток, который объединяет в себе ряд свойств взрослых стволовых клеток и эмбриональных стволовых клеток [1, 2]. В силу того, что МСК из перинатальных тканей имеют тесные онтогенетические связи с эмбриональными стволовыми клетками, им присуща большая мультипотентная пластичность, более выраженная иммуносупрессивность, более высокая скорость пролиферации, чем у МСК из таких источников, как костный мозг и жировая ткань [3, 4]. В частности, к таким клеткам относятся МСК пуповины, свойства которых позволяют использовать их в качестве аллогенных.

Одной из самых важных характеристик МСК являются иммуномодуляторные свойства. Известно, что терапевтический эффект МСК связан именно с этими свойствами и обусловлен, в первую очередь, взаимодействием МСК с клетками иммунной системы и, таким образом, с воздействием на воспаление, которым сопровождаются практически все заболевания. Важнейшим параметром в клеточной терапии любого заболевания является доза МСК, которая может обеспечить терапевтический эффект. Целью данной работы было изучение влияния разных доз МСК пуповины человека на острое воспаление. Исследование проводилось на модели перитонита у мышей, индуцированного интраперитонеальным введением стерильного 3% раствора протеозного пептона.

Материалы и методы

Исследования проводили на половозрелых (2–3 мес.) мышах-самцах линии BALB/c. весом 25–30 г. Всех животных во время опыта содержали в стандартных условиях, разделив на контрольную и экспериментальную группы. Все эксперименты проводили в соответствии с принятыми этическими нормами по работе с лабораторными животными [5].

Индукция стерильного воспаления. Перитонит у мышей вызывали интраперитонеальным введением 1 мл 3 % раствора протеозного пептона (Bacto Proteose Peptone (enzymatic digest of animal tissue) France). Животным контрольной группы параллельно вводили 1 мл физиологического раствора [6].

Получение клеток перитонеальной полости. Эксудат из перитонеальной полости получали промыванием 5 мл холодной среды альфа-МЕМ через 4 часа после введения МСК. Развитие воспаления оценивали по общему количеству клеток и макрофагов, в частности, в перитонеальном эксудате. Жизнеспособность клеток и их общее количество оценивали путем прямого подсчета клеток в камере Горяева [7] с использованием 0,4 %-ного трипанового синего для выявления клеточной гибели.

Определения фагоцитарной активности макрофагов. Перитонеальные макрофаги культивировали в чашках Петри на покровных стеклах для адгезии, что позволяет отделить их от других типов клеток, выделенных из брюшного эксудата. Макрофаги и моноциты идентифицировали после окрашивания по Романовскому-Гимзе (считали в 20 световых полях микроскопа).

Оценку фагоцитарной активности макрофагов осуществляли путем подсчета интернализованных и адгезированных клеток *E. coli* в 100 фагоцитирующих клетках.

Фагоцитарный индекс рассчитывали по следующей формуле: фагоцитарный индекс = количество поглощенных клеток и адгезированных *E. coli* / количество макрофагов × 100 [8].

В качестве морфологической характеристики макрофагов использовали размер клеток, их ядер и ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Выделение и культивирование МСК пуповины человека. МСК выделяли из пуповины человека методом эксплантов. Клетки культивировали в среде альфа-МЕМ, содержащей 10 %

эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ед/мл бензилпенициллина и 100 мг/мл стрептомицина в CO₂ инкубаторе при 5 % CO₂ и 37°C.

Статистическую обработку данных производили, используя компьютерные программы «MS Excel» и «Statistica 10». Различия между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента и считали статистически значимыми при P < 0,05, P < 0,001.

Результаты и обсуждение

МСК пуповины человека, полученные методом эксплантов, были охарактеризованы согласно минимальным критериям, предложенным Международным обществом клеточной терапии для определения МСК человека [9]. Экспрессия поверхностных маркеров гемопоэтических клеток CD 34 и CD 45 практически отсутствовала, а экспрессия поверхностных маркеров, характерных для МСК (CD73, CD90 и CD105) была выше 97 %.

МСК пуповины дифференцировались в трех направлениях – хондрогенном, остеогенном и адипогенном.

Зависимость терапевтического эффекта МСК от дозы изучали на модели стерильного воспаления брюшной полости, индуцированного интраперитонеальным введением 3 % раствора протеозного пептона. Через 24 часа после индукции интраперитонеально вводили различные количества МСК пуповины второго пассажа, ресуспендированные в 0,5 мл физраствора. Через 4 часа содержимое брюшной полости мышей вымывали 5 мл среды альфа-МЕМ без эмбриональной телячьей сыворотки.

Воспаление оценивали по общей клеточности эксудата и количеству фагоцитирующих клеток, представленных в основном макрофагами. Как видно на рис. 1, 2, инъекция раствора протеозного пептона приводит к резкому увеличению как общего количества клеток в брюшной полости (в 3,6 раза), так и к 5-кратному увеличению количества макрофагов по сравнению с контролем (интраперитонеальное введение 0,5 мл физраствора). Введение МСК приводит к угнетению воспаления. Интенсивность угнетения зависит от дозы инъектированных МСК. Количество макрофагов в эксудате резко падает через 4 часа после введения 5×10^3 клеток/мышь (2×10^5 кл/кг), что свидетельствует о снижении интенсивности воспаления. Введение этой небольшой дозы МСК обеспечивает 78 % эффекта, а введение МСК в дозах от 70×10^3 на

мышь приводит к полному возвращению к норме.

Известно, что макрофаги, играющие доминирующую роль в разрешении воспаления, в ходе этого процесса активируются либо в провоспалительном направлении – M1, либо в противовоспалительном – M2 [10–12]. Изучение фагоцитарной активности макрофагов, изменяющейся под влиянием введенных МСК, показало, что самая высокая фагоцитарная активность наблюдается после индукции воспаления (рис. 3). Этот факт предполагает наличие в перитонеальной жидкости макрофагов, активированных в провоспалительный тип, который меняется при введении МСК.

Введение МСК приводит не только к уменьшению количества макрофагов в перитонеальной жидкости, но и изменению их свойств. Исследования последних лет показали, что МСК активно взаимодействуют с макрофагами, поляризуя их, меняя секрет, что обуславливает их терапевтический эффект [13–15]. Их фагоцитарная активность уменьшается, и эти изменения зависят от дозы МСК. Введение высоких доз МСК ($50-100 \times 10^3$ на мышь), которые гасят воспаление, уменьшает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов до наблюдающейся в норме (рис. 4).

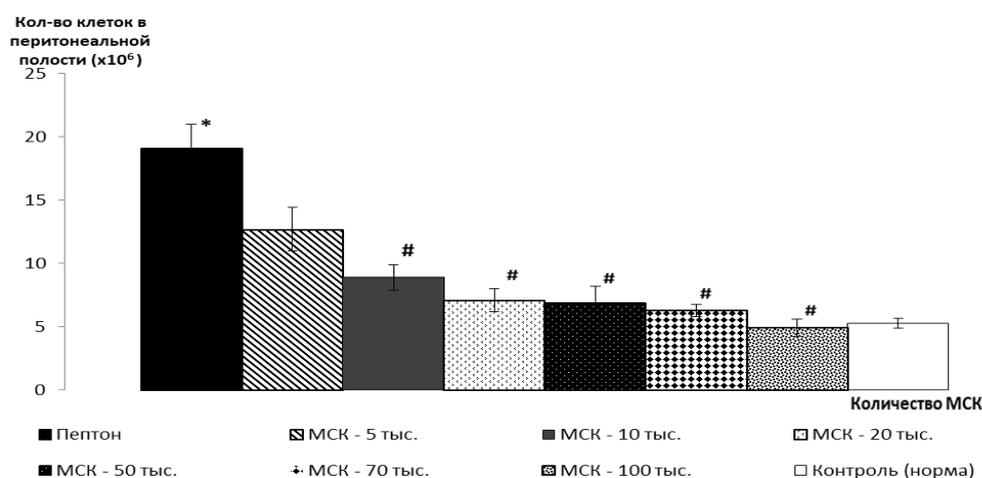


Рис. 1. Общее количество клеток в перитонеальном экссудате брюшной полости мышей, после введения МСК. * – различия по сравнению с контролем (норма) достоверны при $P < 0,05$; # – различия по сравнению с пептоном достоверны при $P < 0,05$.

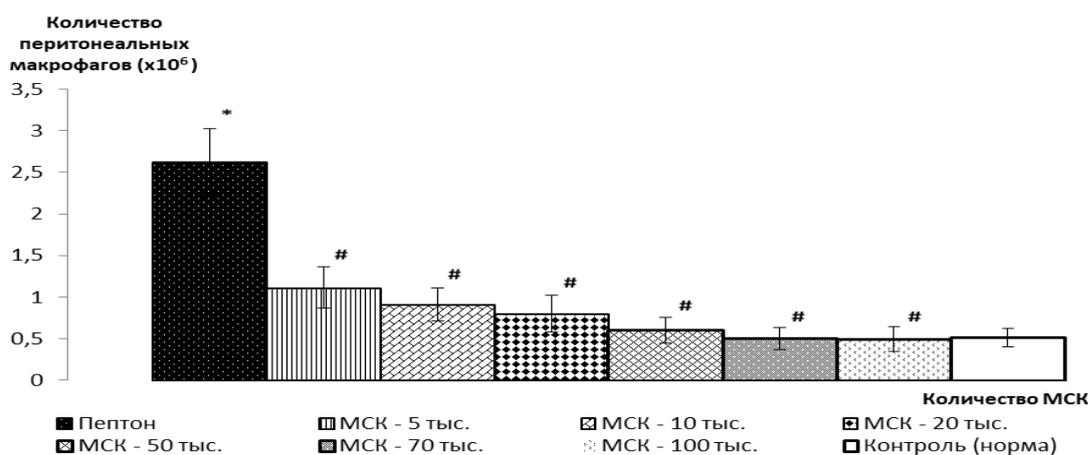


Рис. 2. Количество перитонеальных макрофагов брюшной полости мыши после введения МСК. * – различия по сравнению с нормой достоверны при $P < 0,05$; # – различия по сравнению с положительным контролем (пептон) достоверны при $P < 0,05$.

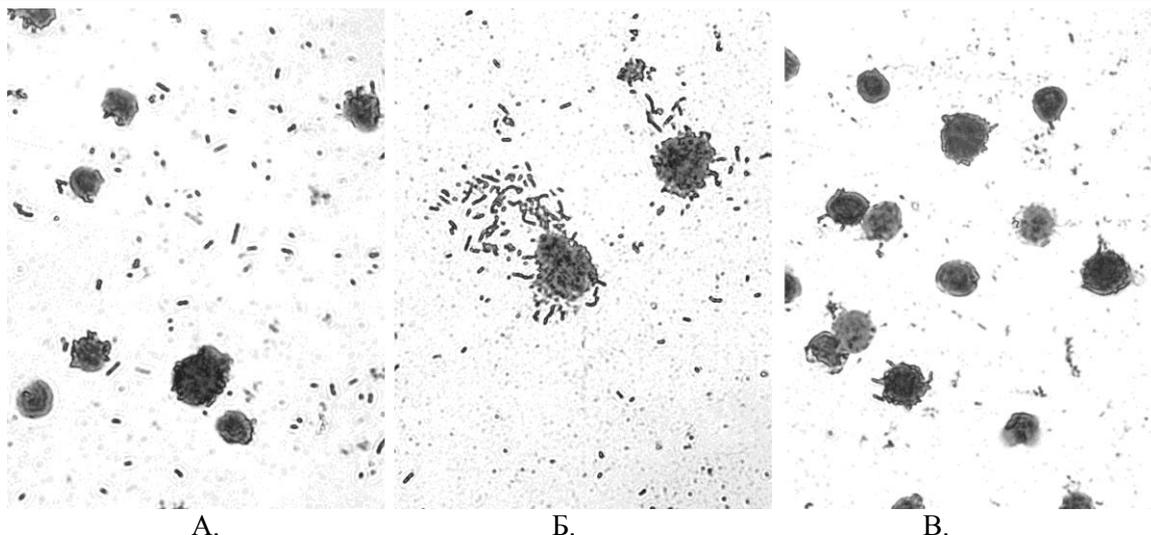


Рис. 3. Оценка фагоцитарной активности макрофагов путем подсчета интернализованных и адгезированных клеток *E. coli*. А – контроль (норма). Б – интраперитонеальное введение пептона. В – макрофаги после введения МСК в развитие острого воспаления. Окрасивание перитонеальных макрофагов по Романовскому-Гимзе. Увеличение $\times 400$.

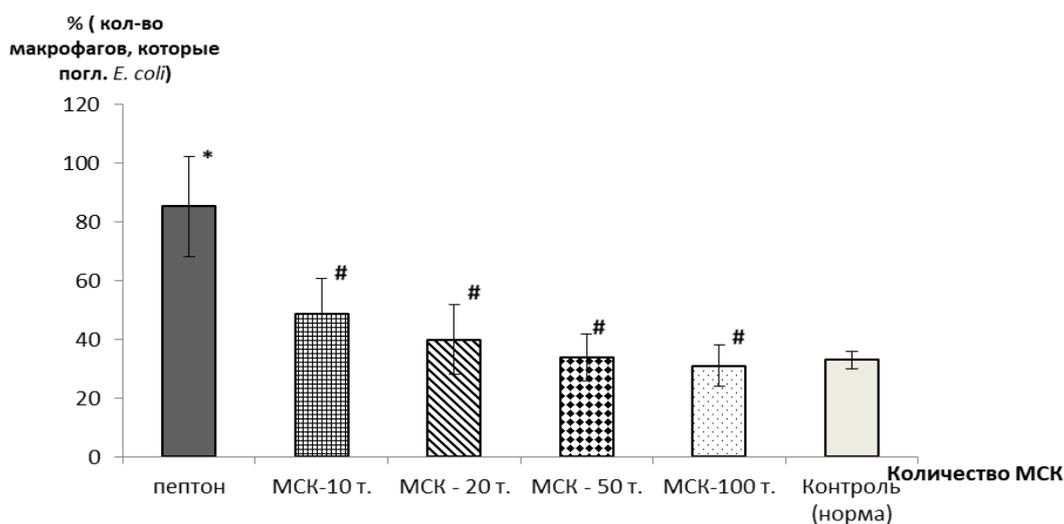


Рис. 4. Подсчет интернализованных и адгезированных клеток *E. coli* в фагоцитирующих макрофагах. * – различия по сравнению с нормой достоверны при $P < 0,001$; # – различия по сравнению с положительным контролем (пептон) достоверны при $P < 0,001$.

В норме в условиях отсутствия воспаления перитонеальные макрофаги представлены наивными макрофагами, которые обладают меньшей фагоцитарной активностью по сравнению с активностью, характерной для макрофагов фенотипа М1 или М2 [16]. Полученные нами результаты по фагоцитарной активности макрофагов демонстрируют изменение фенотипа макрофагов в ходе развития воспалительного процесса в перитонеальной полости и его угасания под влиянием МСК пуповины человека.

Выводы

Показано дозозависимое снижение интенсивности острого воспаления брюшной полости у мышей при введении МСК пуповины человека. Количество макрофагов в перитонеальном экссудате снижается на 78 % при введении 5×10^3 клеток на мышь. Полное угнетение воспаления наблюдается при введении $70-100 \times 10^3$ клеток. Угнетение воспаления сопровождается уменьшением фагоцитарной активности макрофагов, что свидетельствует об изменении их поляризации.

References

1. Semenov O.V., Koestenbauer S., Riegel M., Zech N., Zimmermann R., Zisch A.H. Malek A. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: Critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010. Vol. 202. P. 191–193. doi: 10.1016/j.ajog.2009.10.869.
2. Ilancheran S., Moodley Y., Manuelpillai U. Human fetal membranes: A source of stem cells for tissue regeneration and repair. *Placenta.* 2009. Vol. 30. P. 2–10. doi: 10.1016/j.placenta.2008.09.009.
3. Pappa K.I., Anagnou N.P. Novel sources of fetal stem cells: Where do they fit on the developmental continuum? *Regen. Med.* 2009. № 4. P. 423–433. doi: 10.2217/rme.09.12.
4. Marcus A.J., Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard. *J. Cell. Mol. Med.* 2008. № 12. P. 730–742. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00221.
5. Radzikowski C. Protection of animal research subjects. *Sci. Eng. Ethics.* 2006. Vol. 12. P. 103–110.
6. Caramanis V., Varonos D. The Influence of Acetylsalicylic Acid, Phenylbutazone, Indomethacin, and Flufenamic Acid on the Kinetics Arch. Toxicol., Suppl. 1980. Vol. 4. P. 485–491.
7. Cain D.W., O'Koren E.G. Identification of a tissue-specific, C/EBP β -dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 2013. Vol. 191, № 9. P. 4665–4675. doi: 10.4049/jimmunol.1300581.
8. Chen H.-Y., Weng I., Li Ch.-Sh., Wan L., Liu F.-T. Examination of Galectins in Phagocytosis Methods. *Mol Biol.* 2015. P. 201–213. doi: 10.1007/978-1-4939-1396-1_13.
9. Dominici M., Blanc K.L., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause S., Deans R.J. A Keatin Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006. Vol. 8, № 4. P. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.
10. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004. Vol. 25. P. 677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.
11. Parisi L., Gini E., Baci D., Tremolati M., Fanuli M., Bassani B. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J. of Immunology Research.* 2018. P. 25. doi: 10.1155/2018/8917804.
12. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical functional differentiation. *Frontiers in immunology.* 2014. Vol. 5. P. 514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
13. Lam R.S., Brien-Simpson N.A. Holden Reynolds Unprimed, M1 and M2 Macrophages Differentially Interact with Porphyromonas gingivalis. *PLoS ONE.* 2016. Vol. 11, № 7. P. 11–23. doi: 10.1371/journal.pone.0158629.
14. Eunkyung Chung Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Macrophages in Tissue Repair. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2014. Vol. 11, № 6. P. 431–438. doi: 10.5114/wo.2017.68616.
15. Song Ji-young, Kang H.J., Hong J.S., Kim C.J., Shim J.-Y., Lee C.W., Choi J. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts reduce colitis in mice by repolarizing intestinal macrophages. *Scientific Reports.* 2017. № 138. P. 9. doi: 10.1038/s41598-017-09827-5.
16. Carty B.P. Mahon The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents? *Clinical and Experimental Immunology.* 2017. Vol. 188. P. 1–11. doi: 10.1111/cei.12929.

PIKUS P.^{1,2}, RYMAR S.^{1,2}, SHUVALOVA N.², KORDIUM V.^{1,2}

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: polinaignatchenko7@gmail.com

² State Institution of Genetic and Regenerative Medicine of Natl. Acad. Of Med. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshhorodska str., 67, e-mail: polinaignatchenko7@gmail.com

INFLUENCE OF THE DOSE OF HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS ON ACUTE INFLAMMATION ON THE PERITONITIS MODEL IN MICE

Aim. Study the effect of the dose of human umbilical cord MSCs on acute inflammation on the peritonitis model in mice with intraperitoneal induction of a 3% solution of proteose peptone. Human umbilical cord MSCs can be used in the cell therapy as allogeneic since their properties provide a minimal risk of an immune response with the transplantation MSCs into body. The inflammation follows all diseases and it is base target for MSCs. **Methods.** The study is used methods of cell biology. **Results.** Research has shown that 4 hours after the injection of MSCs, the number of macrophages in the peritoneal cavity of mice immediately decreased. The introduction of 5×10^3 cells per mouse resulted in 78% decrease the number of macrophages in the exudate. Complete return to a normal has been observed with the injection $70\text{--}100 \times 10^3$ of cells per mouse. In parallel with the decrease in the number of macrophages, their phagocytic activity has decreased, and these changes also depend on the dose of transplanted MSCs. **Conclusions.** A dose-dependent decrease of acute inflammation of the abdominal cavity in mice was shown with the introduction of MSCs from the human umbilical cord. The number of macrophages into peritoneal exudate has decreased by 78% in 4 hours after the injection 5×10^3 cells per mouse. Complete suppression of inflammation has observed with the introduction of $70\text{--}100 \times 10^3$ cells. Inhibition of inflammation is accompanied by a decrease in the phagocytic activity of macrophages, which indicates a change in their polarization.

Keywords: human umbilical cord MSCs, inflammation, macrophages, phagocytic activity.

ШКУС П. О.^{1,2}, РИМАР С. Ю.^{1,2}, ШУВАЛОВА Н. С.², КОРДЮМ В. А.^{1,2}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 160, e-mail: polinaignatchenko7@gmail.com

² ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»,

Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, e-mail: polinaignatchenko7@gmail.com

ВПЛИВ ДОЗИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ (СТОВБУРОВИХ) КЛІТИН ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ НА ГОСТРЕ ЗАПАЛЕННЯ НА МОДЕЛІ ПЕРИТОНІТА У МИШЕЙ

Мета. Вивчити вплив дози МСК пуповини людини на гостре запалення на моделі перитоніту у мишей, індукованого інтраперитоніальним введенням 3 % розчину протеозного пептону. МСК пуповини людини можуть бути використані в клітинній терапії у якості алогенних, оскільки їх властивості забезпечують мінімальний ризик імунної відповіді за введення в організм. Запалення, яким супроводжуються всі захворювання, є основною мішенню для МСК. **Методи.** У роботі використані методи клітинної біології. **Результати.** Встановлено, що через 4 години після введення МСК різко падає кількість макрофагів у перитонеальній порожнині миші. Введення 5×10^3 клітин на мишу призводить до зменшення кількості макрофагів в ексудаті на 78 %. Повне повернення до норми спостерігається за введення $70\text{--}100 \times 10^3$ клітин на мишу. Паралельно зі зменшенням кількості макрофагів зменшується їх фагоцитарна активність, і ці зміни також залежать від дози введених МСК. **Висновки.** Доказано дозозалежне зниження інтенсивності гострого запалення черевної порожнини у мишей за введення МСК пуповини людини. Кількість макрофагів у перитонеальному ексудаті падає на 78 % через 4 години після введення 5×10^3 клітин на мишу. Повне пригнічення запалення спостерігається за введення $70\text{--}100 \times 10^3$ клітин. Пригнічення запалення супроводжується зменшенням фагоцитарної активності макрофагів, що свідчить про зміну їх поляризації.

Ключові слова: МСК пуповини людини, запалення, макрофаги, фагоцитарна активність.