

M42 and BAD-1 basic media and modified the vitamins, amino and organic acids media composition. Standard media cannot be used as induction media for Odessa region durum wheat genotypes since the level of induction on that media was low. Embryo formation frequency on modified media was higher. **Conclusions.** New induction culture media were developed. The induction media composition impacted on the embryo formation frequency.

Key words: durum wheat, anther culture *in vitro*.

УДК 57.088 + 616.7:616-018.1”712.4”

КОВАЛЬЧУК М.В.¹, ГУЛЬКО Т.П.¹, ДРАГУЛЯН М.В.¹, ШУВАЛОВА Н.С.²,
ДЕРЯБИНА Е.Г.², КОРДИУМ В.А.^{1,2}

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,

Украина, 03143, г. Киев, ул. Заболотного, 150, e-mail: kovmv@ukr.net

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

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

ИЗМЕНЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖИВОТНЫХ С ИНДУЦИРОВАННЫМ ОСТЕОАРТРИТОМ ПОСЛЕ ВНУТРИСУСТАВНОГО ВВЕДЕНИЯ МСК

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) вызывают в последнее время повышенный интерес, поскольку они имеют способность мигрировать в сайты повреждения тканей, могут дифференцироваться в разные типы клеток, имеют иммуномодулирующие свойства, легко выделяются и масштабируются в условиях *ex vivo*. МСК модулируют иммунные ответы в организме и изменяют течение различных воспалительных заболеваний, поэтому часто терапевтический эффект МСК осуществляется через их иммунорегуляторные функции [1–3].

Тот факт, что МСК *in vitro* могут ингибировать пролиферацию как сингенных, так и аллогенных лимфоцитов, а также уходить от иммунного надзора при трансплантациях, дал надежду на то, что МСК можно использовать в клинике как «универсальные» иммунопривилегированные доноры биологически активных веществ, игнорируя отличия по главному комплексу гистосовместимости (ГКГ). С другой стороны, исследования на лабораторных животных показали, что аллогенные МСК запускают донор-специфические иммунные реакции у реципиента [4, 5].

В частности, МСК человека и ряда других млекопитающих, не экспрессируют антигены II класса ГКГ при нормальных физиологических условиях, тогда как индукция их экспрессии определяется при дифференциации клеток [6]. При введении МСК в поврежденные ткани может наблюдаться их дифференциация, что ведет к появлению или усилению экспрессии антигенов I и II классов ГКГ и синтезу донор-

специфических алло-антител в сыворотке экспериментальных животных, что способствует удалению клеток из тканей реципиента. Встает вопрос о пересмотре концепции иммунопривилегированной природы МСК при алло- и ксенотрансплантациях. Этому также способствуют факты лишь кратковременного выживания трансплантированных МСК у иммунокомпетентного реципиента, а также ряд изменений в субпопуляциях клеток иммунной системы реципиента под действием донорных МСК.

Так как МСК обладают противовоспалительными свойствами и принимают участие в репарации тканей, мы исследовали влияние МСК Вартоновского студня пуповины человека на процесс восстановления хрящевой ткани при индуцированном остеоартрите у крыс. Остеоартрит – наиболее частое ревматическое заболевание, которое характеризуется дегенерацией суставного хряща, в основном, благодаря изменениям в сторону катаболической активности и уменьшению количества хондроцитов. Способность последних восстанавливать матрикс снижается как с возрастом, так и при ряде повреждений [7]. Если происходит восстановление, то часто образуется неполноценный хрящ с пониженным содержанием коллагена второго типа и агрекана. Показано, что МСК защищают хондроциты от дегенерации, связанной с развитием остеоартрита [8].

Целью нашего исследования было

установление времени пребывания МСК в поврежденном суставе (выживаемость донорных МСК на фоне динамики восстановления хрящевой ткани) и выявление изменений в популяциях лейкоцитов в периферической крови реципиента при локальном введении МСК.

Материалы и методы

Лабораторные животные. В качестве экспериментальных животных использовались крысы линии Wistar, самцы, вес 180–200 г. Животные содержались в стандартных условиях (температура 21–23 °С, влажность 30–70 %, 12 часовой период освещения, корм и вода – ad libitum).

Выделение МСК. МСК были получены из матрикса (Вартоновое студня) пупочного канатика человека методом эксплантов. МСК культивировали до 2-го пассажа, в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (РАА, Австрия), с добавлением бензилпеницилина (100 ед/мл среды), стрептомицина (100 мкг/мл среды), 2 mM L-глутамина (Sigma-Aldrich, США), FGF2 (2,5 нг/мл среды («Рефиброл», Интерфармбиотек, Украина) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (РАА), в пластиковых флаконах для культивирования (75 см²) (РАА, Австрия). На каждом пассаже клетки подсчитывали и анализировали экспрессию поверхностных маркерных белков CD90, CD73 и CD105, с помощью антител, меченных флуоресцентными метками, на проточном цитофлуориметре FACSAria [9]. Процент клеток, несущих маркерный белок на 2-м пассаже, во всех опытах был выше 89 %.

Получение модели остеоартрита у крыс. Животным (в возрасте 1,5 мес.) внутрисуставно вводили 0,1 мл йодуксусной кислоты (3 мг йодуксусной кислоты в 50 мкл 0,9 % NaCl) [10]. На 7-е сутки животным с индуцированным остеоартрозом проводили инъекцию $1,5 \times 10^6$ МСК человека в 50 мкл ФБР.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК из внутрисуставных смывов и МСК выделяли по Гринбергу [11]. ДНК из внутрисуставных соскобов выделяли по Брейну и соавт. [12]. Концентрацию и качество ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Berlin, Germany).

Полимеразная цепная реакция. Детекцию клеток, содержащих ДНК человека у крыс, проводили с помощью праймеров, амплифицирующих альфа-сателлитную ДНК

человека, расположенную в участках центромерного хроматина всех хромосом человека [13]. Полимеразную цепную реакцию проводили в 0,5 мл-микропробирках на приборе ТП4 – ПЦР01 «Терцик» («ДНК-технология», РФ) по следующей программе: денатурация при 95 °С – 30с, отжиг при 60 °С – 30с и элонгация при 72 °С – 30с. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 10x ПЦР буфер, 0,2 mM нуклеотидтрифосфаты, (каждого dNTP), 3 mM хлорид магния, Taq-полимеразу «Fermentas» (Литва), ДНК и праймеры к альфа-ДНК человека («Синпол», Россия):

Для ПЦР использовали следующие олигонуклеотиды:

Cr17_1a f(5'-GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA ACA G-3') 15..39

Cr17_2b r(5'-TTC CGT TTA GTT AGG TGC AGT TAT C-3') 867..891 [13].

Размер ампликона составляет 867 bp.

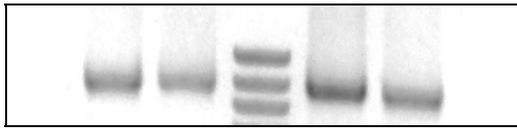
Разделение продуктов амплификации проводили в 1,2 % агарозе в ТАЕ с последующей визуализацией в ультрафиолетовом освещении с использованием бромистого этидия. В качестве маркеров длины фрагментов продуктов ПЦР использован маркер GeneRuler™ 50 п. н. («Fermentas», Lithuania).

Результаты и обсуждение

Развитие экспериментального остеоартрита у крыс путем инъекции в коленный сустав йодуксусной кислоты сопровождалось как разрушением хрящевой поверхности сустава, так и воспалительными процессами в окружающих тканях. После введения МСК проводили детекцию ксеногенного материала с использованием метода ПЦР. Вследствие многокопийности альфа-сателлитной последовательности метод обладает высокой чувствительностью.

Для изучения выживаемости донорных МСК и динамики тканевых изменений в месте их введения (поврежденном коленном суставе) через 0,5, 2, 24 часа и 7 суток получали смывы и соскобы с хрящевой поверхности сустава, которые использовали для выделения ДНК, служащей матрицей для ПЦР (рис. 1).

Как видно из результатов ПЦР, альфа-ДНК человека выявляется в полости сустава по крайней мере на протяжении суток. Через 7 суток альфа-ДНК МСК в реакции амплификации не выявлялась при чувствительности метода в наших опытах 1 клетка донора на 10000 клеток реципиента.



1 2 3 4 5 6 7

Рис. 1. Результаты ПЦР на наличие альфа-ДНК человека в образцах из полостей поврежденных суставов крыс после введения МСК матрикса пуповины человека через разные промежутки времени. 1 – смыв из сустава после введения физиологического раствора (контроль) 30 мин; 2 – смыв после 30 мин; 3 – хрящевая поверхность сустава после 30 мин; 4 – маркер молекулярного веса 100 bp DNA Ladder (Fermentas); 5 – ДНК МСК; 6 – смыв после 24 часов; 7 – смыв после 7 суток

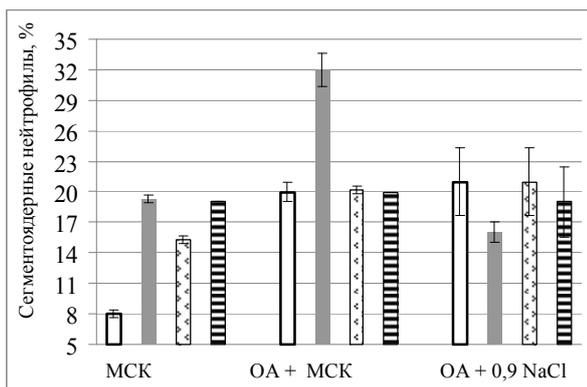
Исходя из непродолжительности существования ксеногенных клеток в пораженном суставе, можно предположить, что последние элиминировались иммунной системой животного. Для того, чтобы оценить иммуногенность МСК пуповины в экспериментальных животных, мы определяли ответ иммунной системы по изменению пулов клеток белой крови. Анализировались образцы периферической крови, собранные в день введения МСК, и на 7, 14, 21 день после внутрисуставной инъекции МСК. Оценивались следующие группы животных: 1) интактные

животные + МСК; 2) животные с индуцированным остеоартритом + МСК; 3) животные с индуцированным остеоартритом + ФБР (рис 2).

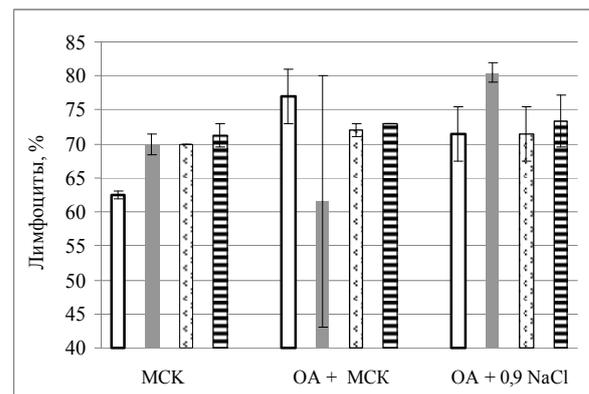
Полученные результаты показали однозначное узнавание МСК клетками иммунной системы реципиента, о чем свидетельствует увеличение пула нейтрофилов в периферической крови, что было отмечено и в других работах [14]. Наблюдалось достоверное увеличение лимфоцитов в группе интактных животных после введения МСК (рис. 2). В обеих группах животных с индуцированным остеоартритом не обнаруживалось существенных количественных изменений после введения МСК, что могло быть связано с первичной воспалительной реакцией иммунной системы животных на «собственно» повреждение тканей при внутрисуставной инъекции.

Выводы

По результатам ПЦР, ДНК человека, введенная с трансплантированными МСК, выявлялась в течение первых суток после инъекции. После введения МСК отмечались достоверные изменения в популяциях лейкоцитов периферической крови модельных животных, что свидетельствует об иммуногенности МСК человека для животных с индуцированным остеоартритом.



А



Б

□ точка введения МСК; ■ 7 день после введения МСК;
 ××××× 14 день после введения МСК; ▨ 21 день после введения МСК.

Рис. 2. А – количество нейтрофилов (%) в периферической крови трех групп животных в день введения МСК и через 7, 14 и 21 дней после инъекции. ($p < 0,05$). Б – количество лимфоцитов (%) в периферической крови трех групп животных в день введения МСК и через 7, 14 и 21 день после инъекции ($p < 0,05$)

Литература

1. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation // *Immunol. Cell Biol.* – 2013. – 91. – P. 19–26.
2. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2005. – 11. – P. 321–334.
3. Lindolfo da Silva Meirelles, Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas, Arnold I. Caplan Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – 20. – P. 419–427.
4. Schu S., Nosov M., Lisa O’Flynn L., Shaw G., Treacy O., Barry F., Murphy M., O’Brien T., Ritter T. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells // *J. Cel. Mol. Med.* – 2012. – 16, N 9. – P. 2094–2103.
5. Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B., Lurvink E.G., Willemze R., Fibbe W.E. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting // *Blood.* – 2006. – 108. – P. 2114–2120.
6. Huang X.P., Sun Z., Miyagi Y., McDonald Kinkaid H., Zhang L., Weisel R.D., Li R.K. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair // *Circulation.* – 2010. – 122. – P. 2419–2429.
7. Loeser R.F., Goldring S.R., Scanzello C.R., Goldring M.B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ // *Arthritis Rheum.* – 2012. – 64. – P. 1697–1707.
8. Ter Huurne M., Schelbergen R., Blattes R., Blom A., de Munter W., Grevers L.C., Jeanson J., Noel D., Casteilla L., Jorgensen C., van den Berg W., van Lent P.L. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis // *Arthritis Rheum.* – 2012. – 64. – P. 3604–3613.
9. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* – 2006. – 8. – P. 315–317.
10. Bendele A.M. Animal models of osteoarthritis // *Musculoskel Neuron Interact.* – 2001. – 1, N 4. – P. 325–329.
11. Grimberg J., Nawoschik S., Belluscio L., McKee R., Turck A., Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – 17. – P. 8390.
12. Biase F.H., Franco M.M., Goulart L.R., Antunes R.C. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues // *Genet. Mol. Biol.* – 2002. – 25. – N 3–4. – P. 313–315.
13. Becker M., Nitsche A., Neumann C., Aumann J., Junghahn I., Fichtner I. Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems // *Br. J. Cancer.* – 2002. – 87, N 11. – P. 1328–1335.
14. Samoa I.A., Dufour J., Lanclos C., Brunt J., Phinney D.G. Cell-dose-dependent increases in circulating levels of immune effector cells in rhesus macaques following intracranial injection of allogeneic MSCs // *Exp. Hematol.* – 2010. – 38, N 10. – P. 957–967.

KOVALCHUK M.V.¹, GYLKO T.P.¹, DRAGULJAN M.V.¹, SHUVALOVA N.S.², DERYABINA O.G.², KORDUM V.A.^{1,2}

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kovmv@ukr.net*

²*State Institute “Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine”, Ukraine, 04114, Kiev, Vyshgorodska str., 67*

CHANGES IN CIRCULATING LEUKOCYTE POPULATIONS FOLLOWING INTRAARTICULAR INJECTION hMSC IN ANIMAL OSTEOARTHRITIS MODEL

Aim. To investigate the transplanted human Wharton’s Jelly MSC survival in rat model of experimental osteoarthritis, and changes in circulating leukocyte populations following MSC injection. **Methods.** Culturing of MSC *in vitro*. PCR analysis of DNA from animal tissue. Blood cell count and calculation of circulating lymphocyte subpopulations **Results.** It has been shown by PCR that human alpha-DNA can be detected during one day in the wounded hosts inside injured stifle joint. Blood cell count revealed reliable changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood. **Conclusions.** Detection of MSC donor DNA was negatively correlated with time from MSC injection to sample collection. MSC transplantation induced transient reliable increases in circulating white blood cells, lymphocytes, and neutrophils in most transplant recipients but not control animals. This study demonstrates that hMSCs are weakly immunogenic *in vivo* in animal osteoarthritis model.

Key words: hMSC, survival, immunogenicity, osteoarthritis model.