УДК 577.27:576.52:57.085.23:576.536+57.017.35

Д. О. Зубов[1], В. М. Оксимець[2]

ОСТЕОІМУНІТЕТ ТА КУЛЬТИВОВАНІ МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ

[1]Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України
03150, м. Київ, вул. Червоноармійська, 57/3; e-mail: zoubov77@yahoo.com
[2]Донецький науково-дослідний інститут травматології та ортопедії
Донецького національного медичного університету ім. М. Горького
83048, м. Донецьк, вул. Артема, 106

Зубов Д. О., Оксимець В. М. **Остеоімунітет та культивовані мезенхімальні стовбурові клітини.** – Наведено результати функціонально-фенотипових досліджень культивованих ліній мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку людини – некомітованих та комітованих за остеогенним шляхом. Одержані данні узагальнено в межах концепції про остеоімунітет. Розглядаються можливі шляхи активації остеорепарації та представлена остеоімунна концепція відновлення порушених остеорепаративних процесів трансплантованими аутологічними мезенхімальними стовбуровими клітинами у травматологічних пацієнтів.

Ключові слова: остеоімунітет, мезенхімальні стовбурові клітини, остеорепаративний процес, остеогенна індукція, лужна фосфатаза, клітинний фенотип, CD-маркери, цитокіни.

Вступ

Імунна система безпосередньо впливає на фізіологію кістки. Останнім часом у світовій літературі почала формуватися концепція про остеоімунітет, або існування остеоімунної системи, функціонування якої тісно пов’язане з процесами активації Т-клітин та асоційованої втрати маси кістки при аутоімунних захворюваннях, вірусній інфекції і запаленні, сприяють цьому утворення метастазів, інфекція, переломи або артрит [3, 5-7]. Взагалі, термін "остеоімунологія" вперше застосували в 2000 р. J. Aaron та Y. Choi [1], де вони вказали на тісну взаємодію імунної та скелетної систем у випадках аутоімунних та запальних захворювань. При остеоімунних процесах не останнє місце відіграють імунорегуляторні гормони, що контролюють кісткоутворення на системному рівні – парат-гормон, статеві гормони, глюкокортикоїди [3]. Існує й чіткий контроль остеогенезу також на місцевому рівні за рахунок таких факторів, як, наприклад, інсуліноподібний фактор росту (ІФР), трансформуючий фактор росту β (ТФР-β), кісткові морфогенетичні білки (КМБ), фактор росту фібробластів (ФРФ), а також цитокіни (ЦК) [2]. Але якщо роль більшості місцевих факторів у фізіології кістки є відомою, то щодо ЦК, неімунних клітинних джерел їхньої продукції та їхньої ролі в процесах остеогенезу, остеорепарації або кісткової резорбції, дані в літературі відсутні. Тобто постає питання щодо функціонального статусу клітин-попередників, в тому числі мезенхімальних стовбурових або стромальних, клітин кісткового мозку (МСК), остеобластів та остеокластів при патологічних станах, зокрема, в кістковій рані, та яким чином гуморальні та клітинні фактори впливають на остеоімунні процеси, що мають місце при порушеннях остеорепарації та загоєнні переломів кісток.

Отже, з’ясування ролі МСК, як потенційних індукторів остеоімунних процесів у кістковій рані, є вельми актуальним та має важливе теоретичне і практичне значення для подальшого вивчення процесів порушеної остеорепарації, а також оптимізації технологій трансплантації МСК. До того ж клінічні дослідження показали, що трансплантація аутологічних МСК сприяє остеогенезу та дозволяє відновити цілісність кісткової тканини при її дефектах у пацієнтів з переломами кісток нижніх кінцівок, що тривалий час не зростаються [8, 15, 18, 19].

Матеріали та методи досліджень

МСК ізолювали згідно з загальноприйнятою методикою [4] з аспірата кісткового мозку при пунктируванні грудини або гребеня клубової кістки у пацієнтів травматологічного профілю і культивували в ростовому середовищі DMEM/F12 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Біолот, Росія) і мітогенів у CO_2-інкубаторі (Jouan, Франція) при температурі 37°С в атмосфері з 5% вмістом CO_2. Таким чином отримували

першу експериментальну групу – *некомітовані МСК*. Остеогенну індукцію ліній МСК здійснювали шляхом внесення до вище зазначеного ростового середовища 0,1 мкМ дексаметазону, 10 мМ *β*-гліцерофосфату і 50 мкг/мл аскорбінової кислоти (Sigma, США) та отримували другу експериментальну групу – *остеоіндуковані або комітовані за остеогенним шляхом, МСК*.

Визначення лужної фосфатази (ЛФ) в супернатантах клітинних культур МСК 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 твердофазного сендвіча – BD OPTEIA Human ELISA (BD Biosciences, США). Вимірювання проводилися за оптичною щільністю одержаного розчину з використанням фотометра для багатофункціонального аналізу Synergy HT Bio-Tek Instruments і програми KC4 System (США).

Одержані дані було виражено як середнє значення із стандартною помилкою середнього та статистично проаналізовані за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Попередні результати наших досліджень було наведено в роботах [8-12, 14, 15]. У цій статті здійснено узагальнення отриманих експериментальних даних щодо функціонально-фенотипових властивостей культивованих МСК людини. Раніше ми надавали теоретичного обґрунтування функціонального імунорегуляторного статусу та можливості індукції МСК кісткового мозку людини за остеогенним шляхом, що призводить до змін рецепторного апарату та цитокінової продукції клітинами, що досліджуються, і стимуляції за рахунок остеоімунних гуморальних та клітинних взаємодій порушеного остеорепаративного процесу. Було встановлено, що комітовані за остеогенним шляхом імунорегуляторні культури МСК людини з 10-ї доби індукції починають продукувати ЛФ (вона ж остаза – маркерний фермент остеобластів та остеогенних ліній) на рівні 78% ($p<0,05$). Максимальна кількість позитивних за ЛФ культур спостерігалася з 13-ї до 19-ї доби остеоіндукції – 90% ($p<0,05$). Визначено, що впродовж тритижневого процесу остеогенної індукції імунорегуляторні МСК змінюють морфологію з фібробластоїдних недиференційованих активно проліферуючих та непродукуючих ЛФ клітин на майже непроліферуючі розпластані відросчаті округло-багатокутні клітини, що активно продукують ЛФ [8, 10].

Встановлено, що загальними мембранними антигенами, згідно панелі, що досліджується, для некомітованих та комітованих за остеогенним шляхом МСК людини за умов їхнього культивування є: CD44, CD166, CD58, CD62L, CD29, CD49b, CD49c і CD54. Не ідентифікуються CD49a і HLA A, B, C (табл. 1). Після остеоіндукції комітовані МСК, на відміну від некомітованих, починають експресувати HLA-DR на рівні поодиноких клітин ($p<0,05$), та припиняють експресувати CD56 ($p<0,05$) [9, 10].

Загальний спектр імунорегуляторних цитокінів, які продукуються некомітованими та комітованими за остеогенним шляхом культурами МСК людини в умовах культивування, представлений інтерлейкінами – ІЛ-1β, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8 і ФНП-α (фактор некрозу пухлин альфа). Вперше показана секреція ІЛ-1β та ІЛ-2 культивованими некомітованими МСК (ІЛ-1β – 32,7±4,9 пг/мл, ІЛ-2 – 10,4±1,4 пг/мл) та виявлене збільшення рівня секреції ІЛ-1β та ІЛ-2 комітованими за остеогенним шляхом МСК (ІЛ-1β – до 47,8±3,2 пг/мл та ІЛ-2 – до 14,4±0,5 пг/мл ($p<0,05$)). Вперше показана гіперпродукція ІЛ-6 та ІЛ-8 культивованими некомітованими МСК людини (ІЛ-6 – 101,4±3,2 пг/мл, ІЛ-8 – 262,0±25,0 пг/мл ($p<0,05$)) та комітованими за остеогенним шляхом МСК людини (ІЛ-6 – до 276,5±5,6 пг/мл, ІЛ-8 – до 106,6±4,3 нг/мл ($p<0,05$)) [11, 12].

Таблиця 1

Результати бальної оцінки імуномаркування некомітованих та комітованих за остеогенним шляхом мезенхімальних стовбурових клітин людини 1-4 пасажів, (M ± m)

CD	Антиген	Некомітовані МСК		Комітовані МСК	
		1-2 (n=5)	3-4 (n=17)	1-2 (n=12)	3-4 (n=13)
Рівень експресії молекул активації та костимуляції					
58	LFA-3	1,6±0,2	1,6±0,2	1,4±0,2	1,5±0,1
166	ALCAM	3,8±0,2	3,9±0,1	4,8±0,1	4,9±0,1
56	NCAM	3,8±0,2	3,9±0,1	0,3±0,1*	0,2±0,1*
54	ICAM-1	1,2±0,2	2,5±0,2	2,7±0,1*	2,8±0,1
Рівень експресії молекул ендотелій-опосередкованої адгезії					
62L	L-селектин, LECAM-1	1,8±0,4	1,9±0,2	1,7±0,1	2,1±0,2
Рівень експресії молекул міжклітинної адгезії					
44	HCAM	4,8±0,2	4,9±0,1	4,9±0,1	5,0
Рівень експресії інтегринових субодиниць					
29	інтегрин β1	2,8±0,2	2,7±0,1	3,1±0,2	3,5±0,2*
49a	інтегрин α_1	0	0	0,2±0,1	0
49b	інтегрин α_2	3,6±0,2	3,9±0,1	3,5±0,2	3,8±0,1
49c	інтегрин α_3	3,2±0,2	3,3±0,1	2,7±0,1	3,0±0,2
Рівень експресії молекул HLA					
-	HLA A, B, C	0	0	0	0
-	HLA-DR	0	0	0,3±0,1	0,5±0,1*

Примітка. * – позначена статистично значима зміна ($p<0,05$) експресії антигену комітованими МСК порівняно з некомітованими.

Узагальнюючи отримані данні, спробуємо дати відповідь на питання, в чому виражається остеоімунна та імунорегуляторна роль культивованих МСК при порушеннях процесу остеорепарації за умов їхньої аутологічної трансплантації в ділянку перелому із сповільненою консолідацією? Для відповіді слід зіставити результати даних функціонально-фенотипових досліджень культивованих МСК з відомими остеоімунними та імунорегуляторними механізмами і фазами протікання всього процесу остеорепарації, починаючи з перелому та виникнення порушень загоєння кісткової рани, закінчуючи фінальною фазою утворення пластинчастої та губчастої кісткової структури *de novo* [16], як це відтворено на рис. 1-3.

З одержаних даних можна припустити, що трансплантовані в ділянку перелому, що сповільнено консолідується, культивовані аутологічні МСК, за рахунок поверхневої експресії різних функціональних молекул і секреції ЦК, виступають ефективними активаторами порушеного остеорепаративного процесу та остеоімунних взаємодій. Особливо ефективною трансплантація культивованих аутологічних МСК кісткового мозку людини може виявитися в тих випадках, коли остеорепаративний процес набуває хронічного характеру [18, 19].

Спектр вивчених нами поверхневих антигенів у роботах [9, 10], що експресується культивованими МСК, можна схематично узагальнити в декілька функціональних груп (див.

табл. 1). *Група поверхневих антигенів, що беруть участь у клітинно-матриксних взаємодіях "МСК-ПКМ"* та ті, що сприяють розвитку процесів міграції МСК у рані та остеобластогенезу; це CD29, CD49b, CD49c і CD44 (рис. 1 А). *Група поверхневих антигенів, що беруть участь у процесі залучення в місце кісткового дефекту клітин моноцитарно-макрофагального ряду* (у тому числі преостеокластів): CD54 (рис. 1 Б). *Група поверхневих антигенів, що беруть участь у процесі активації імунокомпетентних клітин, котрі запускають розвиток реакцій ланки специфічного імунітету*, це – CD54, CD58, CD62L і CD166 (рис. 1 В). Відносно до взаємодій "лімфоцит-остеобласт", зараз набуває важливості факт участі остеобластів в остеоімунних процесах. Схоже, що ці клітини мають антиген-презентуючими властивості, оскільки було показано, що вони експресують молекули MHC II класу та адгезини CD54 (ICAM-1) та CD166 (ALCAM) під дією γ-інтерферону, і, таким чином, можуть активувати Т-клітини [4]. Нами також було показано, що комітовані за остеогенним шляхом МСК експресують CD54, CD166 та, незначно, HLA-DR [9, 10]. *Група поверхневих антигенів, що беруть участь у процесі активації імунокомпетентних клітин, котрі запускають розвиток реакцій ланки неспецифічного імунітету*, це – CD56 і CD58 (рис. 1 Г). Культивовані МСК секретують у позаклітинний простір *про- і протизапальні ЦК* (рис. 1 Д).

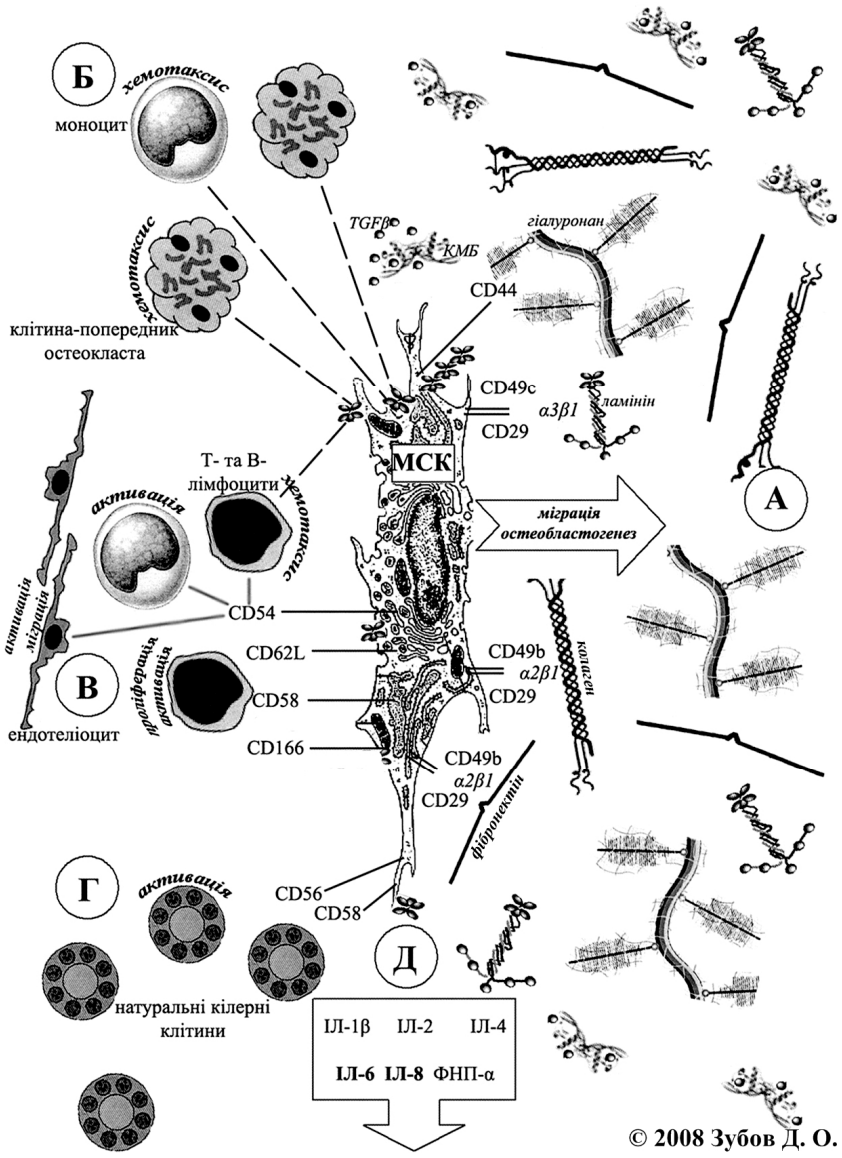

Рис. 1. Гіпотетична схема функціональних остеоімунних взаємодій МСК з молекулами позаклітинного матриксу та імунокомпетентними клітинами, згідно з результатами досліджень

У тривало не консолідуючих переломах має місце явище "остеогенної недостатності" [17], що виражається в існуванні дефіциту клітинних джерел остеорепарації та у формуванні в місці перелому грубоволокнистого рубця. Тобто в даній ситуації проявляється процес субституції кісткової тканини, що призводе до тривалої відсутності консолідації перелому, а сам остеорепаративний процес "завмирає" в проліферативній фазі запалення (рис. 2).

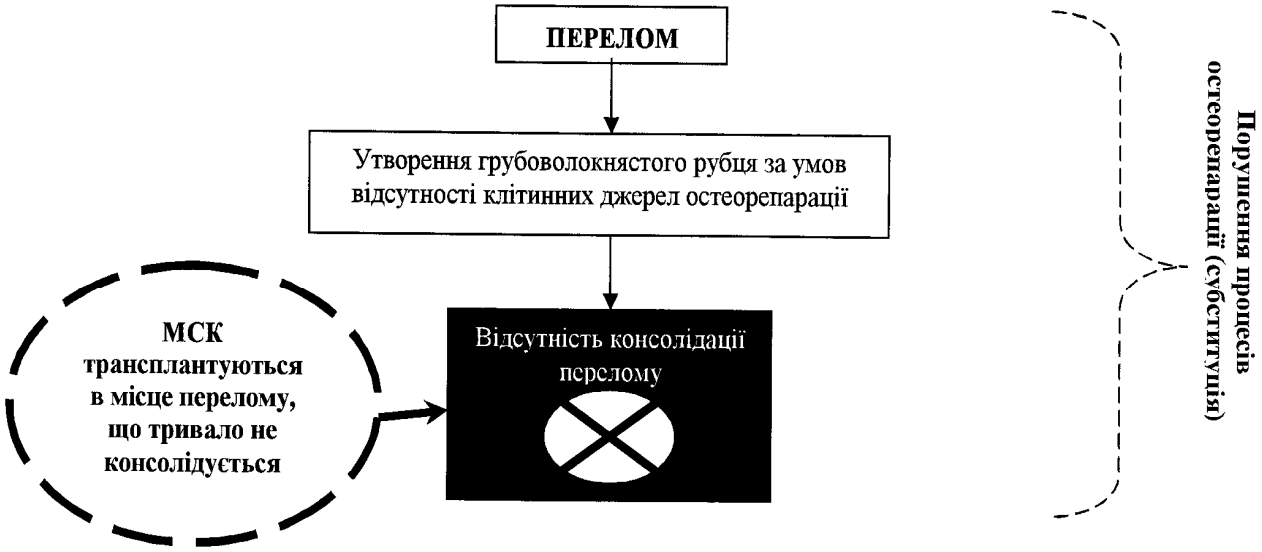

Рис. 2. Схема концепції відновлення порушених остеорепаративних процесів за умов трансплантації аутологічних МСК. Порушення остеорепаративного процесу

Ключовим моментом при трансплантації МСК у місце хронічного остеорепаративного процесу є активація стадії запалення (рис. 3). Тобто протягом ініційованої трансплантованими МСК проліферативної фази запалення в процесі порушеної остеорепарації, імунорегуляторні події спрямовані на створення умов щодо відновлення цілісності кісткової тканини, яке зв'язане з процесами клітинної проліферації і подальшого диференціювання клітинних джерел остеорепарації. Деталізована схема запропонованої нами концепції відновлення порушених остеорепаративних процесів за умов трансплантації аутологічних МСК, згідно з отриманими експериментальними даними [8-12, 14], надана на рис. 2 і 3 (назва стадій та фаз за Н. Коржом і Н. Дєдухом [16]).

Нормальне протікання остеорепарації є комплексним і ретельно налагодженим процесом, котрий регулюється цитокінами та ростовими факторами, а також міжклітинними та клітинно-матриксними взаємодіями [5, 13]. Особливо фаза запалення регулюється функціонально-кооперативними взаємодіями між МСК і імунокомпетентними клітинними популяціями, що привертаються до місця перелому. Безперечно, що всі вище зазначені функціонально-кооперативні взаємодії ґрунтовно вписуються до загальної концепції про остеоімунітет, мають місце під контролем остеоімунної системи організму людини та чітко регулюються нею.

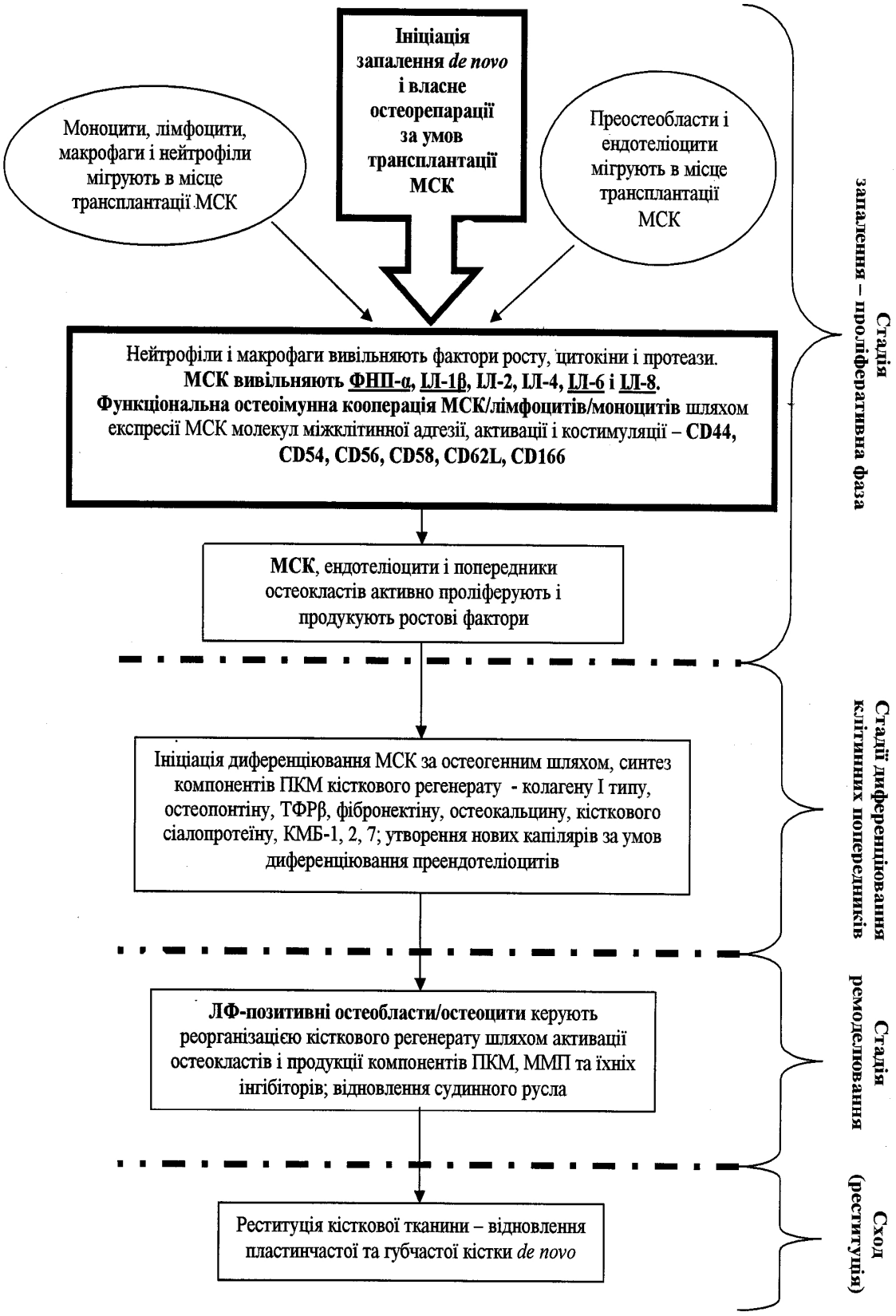

Рис. 3. Схема концепції відновлення порушених остеорепаративних процесів за умов трансплантації аутологічних МСК. Ініціація порушеного остеорепаративного процесу трансплантованими МСК

Висновки

Визначено розбіжності в експресії поверхневих антигенів досліджуваними клітинами *in vitro*: фенотип комітованих за остеогенним шляхом мезенхімальних стовбурових клітин відрізняється від фенотипу некомітованих експресією на рівні поодиноких клітин HLA-DR та припиненням експресії CD56; вперше визначено особливості та розбіжності в секреції спектра цитокінів некомітованими та остеоіндукованими МСК *in vitro*: культивовані некомітовані та комітовані МСК продукують ІЛ-1β та ІЛ-2, а комітовані за остеогенним шляхом МСК виявляють гіперпродукцію ІЛ-6 та ІЛ-8 до 276,5 пг/мл і 106,6 нг/мл відповідно; вперше досліджений взаємозв'язок змін фенотипу та функціональної активності некомітованих та остеоіндукованих МСК; вперше достовірно показано, що поверхнева експресія різних функціональних молекул і секреція ключових імунорегуляторних цитокінів клітинами, що досліджувалися, дозволяють розглядати культивовані МСК у якості ефективних активаторів кісткової резорбції, запалення і остеоімунних реакцій у процесі порушеної остеорепарації.

Список літератури

1. *Aaron J.* Bone versus immune system / *J. Aaron, Y. Choi* // Nature. – 2000. – Vol. 408. – P. 535-536.

2. *De Vernejoul M. C.* Cellules osseuses et remodelage osseux / *M. C. De Vernejoul, P. J. Marie* // Madadies métaboliques osseuses de l'adulte. – Paris: Flammarion, 1996. – P. 3-16.

3. *Effects* of α/β-androstenediol immune regulating hormones on bone remodeling and apoptosis in osteoblasts / *N. H. Urban, B. Chamberlin, S. Ramage* [et al.] // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2008. – P. 1-7. – Режим доступу до журн.: http://dx.doi.org/10.1016/ j.jsbmb.2008.04.005.

4. *Minguell J. J.* Mesenchymal stem cells / *J. J. Minguell, A. Erices, P. Conget* // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2001. – Vol. 226. – P. 507-520.

5. *Rauner M.* Osteoimmunology / *M. Rauner, W. Sipos, P. Pietschmann* // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2007. – Vol. 143. – P. 31-48.

6. *Rho J.* Osteoimmunology : interactions of the immune and skeletal systems / *J. Rho, M. Takami, Y. Choi* // Mol. Cells. – 2004. – Vol. 17. – P. 1-9.

7. *Takayanagi H.* Cross-talk between immune and skeletal systems / *H. Takayanagi* // Nippon. Rinsho. – 2002. – Vol. 60. – P. 2287-2295.

8. *Возможности* применения культивированных мезенхимальных стволовых клеток в травматологии и ортопедии / *В. К. Гринь, Д. А. Зубов, А. Г. Попандопуло, В. М. Оксимец* // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 55-59.

9. *Зубов Д. А.* Функционально-фенотипическая характеристика культивированных некоммитированных и коммитированных по остеогенному пути мезенхимальных стволовых клеток / *Д. А. Зубов* // Травма. – 2008. – Т. 9, № 3. – С. 297-303.

10. *Зубов Д. А.* Функционально-фенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток человека / *Д. А. Зубов* // Імунологія та алергологія. – 2008. – № 2. – С. 67-72.

11. *Зубов Д. А.* Цитокиновая иммунорегуляция репаративной регенерации костной ткани культивированными мезенхимальными стволовыми клетками / *Д. А. Зубов, В. М. Оксимец* // Травма. – 2008. – Т. 9, № 2. – С. 145-153.

12. *Зубов Д. О.* Імунорегуляторна роль мезенхімальних стовбурових клітин в остеорепаративному процесі / *Д. О. Зубов* // Фізіол. журн. – 2008. – Т. 54, № 4. – С. 30-36.

13. *Иммунологические подходы* в исследованиях дифференцировки клеток кроветворной и соединительной тканей / *Н. Г. Хрущов, Т. В. Мичурина, Т. В. Васильева* [и др.] // Иммунологические аспекты биологии развития. – М., 1984. – С. 166-189.

14. *Индуктивные свойства* носителей мезенхимальных стволовых клеток / *В. Г. Климовицкий, В. К. Гринь, И. В. Василенко, В. М. Оксимец, Д. А. Зубов, В. М. Пастернак, А. Г. Попандопуло, А. А. Антонов* // Травма. – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 243-247.

15. *К вопросу* об обосновании применения культивированных фетальных фибробластов человека в комплексном лечении хронических мезенхимальных дефектов /

А. Г. Попандопуло, О. М. Корчак, О. А. Трунова, Д. А. Зубов, И. А. Разенкова // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2004. – Т. 13, № 1-2. – С. 55-61.

16. *Корж А. А.* Репаративная регенерация кости / *А. А. Корж, А. М. Белоус, Е. Я. Панков.* – М. : Медицина, 1972. – 232 с.

17. *Оптимизация* репаративного остеогенеза трансплантацией стромальных клеток костного мозга / *В. Г. Гололобов, А. К. Дулаев, Р. В. Деев* [и др.] // Клеточная трансплантология. – 2004. – № 1. – С. 15-16.

18. *Трансплантация* аутологичных стромальных стволовых клеток как метод восстановления клеточных источников репарации (пилотные исследования) / *В. Н. Казаков, В. Г. Климовицкий, В. К. Гринь, В. Н. Пастернак, В. М. Оксимец, А. Г. Попандопуло, С. И. Верещагин, Д. А. Зубов* // Травма. – 2006. – Т. 7, № 3. – С. 368-377.

19. *Трансплантация* остеогенных клеток в ортопедии и травматологии / *В. Н. Казаков, В. Г. Климовицкий, В. К. Гринь, В. Н. Пастернак, В. М. Оксимец, А. Г. Попандопуло, Д. А. Зубов* // Журнал академії медичних наук України. – 2006. – Т. 12, № 2.– С. 229-241.

Зубов Д. А., Оксимец В. М. **Остеоиммунитет и культивированные мезенхимальные стволовые клетки. –** Приведены результаты функционально-фенотипических исследований культивированных линий мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека – некоммитированных и коммитированных по остеогенному пути. Полученные данные обобщены в рамках концепции об остеоиммунитете. Рассмотрены возможные пути активации остеорепарации и представлена остеоиммунная концепция восстановления нарушенных остеорепаративных процессов трансплантированными аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками у травматологических пациентов.

Ключевые слова: остеоиммунитет, мезенхимальные стволовые клетки, остеорепаративный процесс, остеогенная индукция, щелочная фосфатаза, клеточный фенотип, CD-маркеры, цитокины.

Zubov D. O., Oksymets' V. M. **Osteoimmunity and cultured mesenchymal stem cells. –** The results of functional and phenotypic studies on cultured human bone marrow derived mesenchymal stem cell lineages – uncommitted and osteogenic committed are considered. The experimental data have been summarized according to the osteoimmunity concept. The probable activating pathways of osteoreparation are discussed and the osteoimmune concept linked with a renewal of altered osteoreparative processes by transplanted autologous mesenchymal stem cells in trauma patients has been proposed.

Key words: osteoimmunity, mesenchymal stem cells, osteoreparation, osteogenic induction, alkaline phosphatase, cell phenotype, CD-cluster of designation (differentiation), cytokines.