

УДК 616.61-005.4-036.11-092.9:616.419-008.853.3

*М. М. ЗАФРАНСКАЯ, Д. Б. НИЖЕГОРОДОВА, Т. В. КОНДРАТОВИЧ, М. Ю. ЮРКЕВИЧ,
К. С. КОМИССАРОВ, Г. И. ИВАНЧИК, С. С. КУЛИНИЧ, В. С. ПИЛОТОВИЧ*

ВЛИЯНИЕ МОНОНУКЛЕАРОВ КОСТНОГО МОЗГА И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ СПЛЕНОЦИТОВ КРЫС *IN VITRO*

*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь,
e-mail: zafranskaya@gmail.com, nzh@tut.by, kondratovich89@list.ru, marija4567@gmail.com, kirill_ka@tut.by,
immunology.by@gmail.com, bagatka_sv@mail.ru, pilotovich@mail.ru*

Изучен иммуномодулирующий эффект свежее выделенных некультивируемых мононуклеаров костного мозга (МоКМ) у крыс. Установлено, что МоКМ оказывают выраженное *in vitro* и *in vivo* антипролиферативное действие на митоген-стимулированные спленциты крыс, сопоставимое с иммуносупрессивным действием мезенхимальных стволовых клеток. Это открывает перспективу применения МоКМ в терапии острых состояний с воспалительным компонентом, включая острую ишемическую нефропатию, для предотвращения отдаленных последствий ишемического поражения органов.

Ключевые слова: клеточная терапия, мононуклеары костного мозга, острая ишемическая нефропатия, спленциты.

*M. M. ZAFRANSKAYA, D. B. NIZHEHARODAVA, T. V. KANDRATOVICH, M. J. YURKEVICH, K. S. KOMISSAROV,
H. I. IVANCHIK, S. S. KULINICH, V. S. PILOTOVICH*

INFLUENCE OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS AND MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE SPLENOCYTE PROLIFERATION OF RATS *IN VITRO*

*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus, e-mail: zafranskaya@gmail.com, nzh@tut.by,
kondratovich89@list.ru, marija4567@gmail.com, kirill_ka@tut.by, immunology.by@gmail.com, bagatka_sv@mail.ru,
pilotovich@mail.ru*

The immunomodulatory properties of fresh isolated uncultivated bone marrow mononuclear cells (BMMNC) were estimated. Revealed BMMNC expressed *in vitro* and *in vivo* antiproliferative effects on mitogen-stimulated rat splenocytes comparable with the mesenchymal stem cells immunosuppression, which offers the challenge of the BMMNC application in therapy of acute conditions with an inflammatory component including acute ischemic nephropathy for preventing ischemic organs affection long-term effects.

Keywords: cell therapy, bone marrow mononuclear cells, acute ischemic nephropathy, splenocytes.

Введение. Терапевтические подходы к восстановлению функции почек при острой ишемической нефропатии (ОИН) – потенциально обратимом прекращении функционирования почек с нарушениями водно-электролитного, азотвыделительного и кислотно-щелочного гомеостаза – в некоторых случаях недостаточно эффективны и, более того, опасны ввиду дополнительного токсического повреждения почечной ткани. Кроме того, иммунная система в ответ на ишемию почечных клеток в 2 раза увеличивает частоту аутоиммунных гломерулопатий и отвечает острой реакцией отторжения в ранние сроки после пересадки почек [1–3].

Клеточные технологии открывают новое перспективное направление в разработке эффективных методов терапии постишемической нефропатии. Проллиферативный и дифференцировочный потенциал, способность к миграции в область повреждения и иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток (МСК) являются основными предпосылками для их успешного использования в восстановлении почечной ткани. Предполагается, что гуморальные механизмы МСК-опосредованного восстановления почки обусловлены продукцией ростовых факторов, которые являются эпителиальными митогенами и морфогенами, обеспечивают регуляцию почечного кровотока и защищают почки от ишемического повреждения [4–7].

Однако лимитирующим фактором, ограничивающим возможности использования МСК при состояниях с выраженным воспалительным компонентом, к которым относится не только ОИН, но и острая ишемия различных органов (инсульт, инфаркт, острый респираторный дистресс-синдром и др.), является длительное (до нескольких недель) время культивирования клеток для получения аутологичного трансплантата [8]. Это, в свою очередь, не позволяет использовать клеточные культуры МСК в период, когда имеется «окно» терапевтической эффективности. Кроме того, некоторыми авторами показано, что в процессе культивирования может изменяться экспрессия генов МСК, снижаться экспрессия хемокиновых рецепторов, в частности CXCR4, который ответственен за хоуминг и приживание трансплантата *in vivo*, и нарушаться способность к мультипотентной дифференцировке [9].

В качестве перспективной альтернативы рассматривается возможность применения свежесодержимых некультивируемых мононуклеаров костного мозга (МоКМ) – гетерогенной клеточной популяции, включающей различные типы клеток: МСК, гемопоэтические стволовые клетки, популяции эндотелиальных клеток-предшественников и др. [5, 10, 11]. МоКМ характеризуются меньшими размерами по сравнению с МСК; выделение фракции МоКМ и подготовка клеток к трансплантации занимает несколько часов и не требует предварительного культивирования, что позволяет осуществлять своевременное введение этих клеток пациенту в острой фазе заболевания и тем самым предотвращает развитие отдаленных последствий ишемического поражения органов [12–16]. Показано, что трансплантированные МоКМ мигрируют в очаг повреждения, секретуют цитокины и трофические факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor), фактор роста фибробластов (FGF, fibroblast growth factor), играющие основную роль в процессе неоваскуляризации ткани и способствующие улучшению кислородного питания ткани [5]. Однако литературных данных, объясняющих механизм противовоспалительного эффекта МоКМ, на сегодняшний день недостаточно.

Цель работы – изучение *in vitro* и *in vivo* иммуномодулирующих эффектов свежесодержимых некультивируемых мононуклеаров костного мозга по сравнению с культурой мезенхимальных стволовых клеток для оценки безопасности и эффективности применения клеточной терапии и последующей разработки принципиально новых подходов лечения острой ишемической нефропатии.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования являлись спленоциты 13 белых половозрелых лабораторных крыс линии Вистар женского пола массой тела 260 (200–335) г с экспериментальной моделью ОИН и 9 здоровых животных аналогичного веса и пола; свежесодержимые некультивируемые МоКМ и культуры МСК ранних пассажей крыс ($n = 4$). Лабораторные животные содержались в стандартных условиях вивария (12-часовой световой день, свободный доступ к воде и пище, температура 18–25 °С).

Для изучения иммуномодулирующих свойств культур клеток в условиях *in vitro* проведена сравнительная оценка способности МоКМ и МСК влиять на неспецифическую (митоген-стимулированную) пролиферацию спленоцитов лабораторных крыс. Для характеристики антипролиферативного эффекта клеточной терапии в условиях *in vivo* проведен пилотный эксперимент трансплантации МСК и МоКМ животным с экспериментальной ОИН.

Моделирование экспериментальной ОИН. Экспериментальную ОИН моделировали у лабораторных крыс с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях (Страсбург, 02.01.1991). Животных наркотизировали, вводя внутривентрально тиопентал натрия, а затем моделировали ОИН путем полного пережатия сосудистой ножки почек на 50 мин. После периода ишемии зажимы снимали, а раны зашивали послойно.

Выделение мононуклеаров костного мозга. Суспензию костного мозга получали из больших берцовых костей лабораторных животных. В стерильных условиях удаляли эпифизы костей, а диафизы промывали культуральной средой. В качестве полной культуральной среды использовали среду DMEM (Gibco, Германия) с добавлением 2 мМ L-глутамин (Invitrogen, Германия), 1 % раствора антибиотика-антимикотика (Gibco, Германия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, Великобритания). Полученную костномозговую суспензию дезагрегировали, наслаивали на одноступенчатый градиент плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,077$ г/см³,

Sigma, Германия) и центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин. Образовавшееся интерфазное кольцо МоКМ дважды отмывали путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин в фосфатно-буферном растворе (Sigma, Германия), содержащем 10 % инактивированной ЭТС (HyClone, Великобритания).

Выделение спленоцитов. Свежевыделенную селезенку измельчали ножницами и очищали от остатков ткани с помощью фильтрования. Полученный гомогенат наслаивали на одноступенчатый градиент плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,083 \text{ г/см}^3$, Sigma, Германия) и центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин. Образовавшееся интерфазное кольцо спленоцитов дважды отмывали путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин в фосфатно-буферном растворе (Sigma, Германия), содержащем 10 % ЭТС (HyClone, Великобритания), и доводили до рабочей концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Выделение и культивирование МСК из костного мозга крыс. Мононуклеары костного мозга в концентрации $(2-4) \cdot 10^5$ клеток/см² высевали на культуральный пластик в среду DMEM, содержащую 10 % ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 1 % раствора антибиотика-антимикотика. По достижении состояния конfluence для диссоциации адгезивных клеток проводили инкубацию клеточных культур с 0,25 %-ным раствором трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma, Германия) в течение 10 мин при 37 °С с последующим двукратным центрифугированием в фосфатно-буферном растворе с 10 % ЭТС (10 мин, 1500 об/мин).

Инфузия МСК или МоКМ лабораторным животным. Через 24 ч после моделирования ОИН в хвостовую вену лабораторных крыс и здоровых животных вводили клеточные культуры МСК второго пассажа в концентрации $3 \cdot 10^5$ на животное ($1 \cdot 10^6/\text{кг}$) ($n = 4$ и $n = 3$ соответственно) и свежевыделенные МоКМ в концентрации $3 \cdot 10^6$ на животное ($1 \cdot 10^7/\text{кг}$) ($n = 5$ и $n = 3$); животным группы сравнения ($n = 4$ и $n = 3$) вводили аналогичный объем (0,3 мл) физиологического раствора. Крыс выводили из эксперимента на 3-и сутки путем введения тиопентала натрия, а затем декапитировали.

Количественный анализ клеточного деления по включению CFSE. Для оценки способности МСК и МоКМ супрессировать митоген-индуцированную пролиферацию спленоцитов все клеточные суспензии в концентрации $1 \cdot 10^7$ клеток/мл предварительно окрашивали 7 мМ 5-(6)-карбоксихлоресцеин диацетатсукцинимидил эфиром (CFSE, Fluka, Словакия). Реакцию останавливали путем отмывания в охлажденной полной культуральной среде, содержащей 10 % ЭТС. Окрашенные клетки использовали для постановки совместного культивирования. Спленоциты крыс культивировали в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток/лунку 96-луночного круглодонного планшета в полной культуральной среде, содержащей 1 мкг/мл конканавалина А (Кон А, Sigma, Германия) в присутствии МСК ранних (1–2-й) пассажей или свежевыделенных МоКМ или в их отсутствие в течение 4 дней при 37 °С в атмосфере с 5 %-ным содержанием CO₂. При постановке совместного культивирования использовали следующие соотношения клеточных культур: спленоциты:МСК – 10:1; спленоциты:МоКМ – 10:1, 5:1, 2:1, 1:1.

Учет результатов клеточной пролиферации проводили на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter, Германия), подсчитывая процентное содержание непролиферирующих и пролиферирующих клеток. Результаты регистрировали на 40 000 клеточных событий.

Для характеристики степени выраженности ингибирующего влияния МСК на пролиферацию спленоцитов использовали формулу расчета коэффициента супрессии (КС) пролиферативного ответа (%):

$$\text{КС} = 100 - \frac{\text{П}_{\text{СПЛ}+\text{МСК}/\text{МоКМ}} \cdot 100}{\text{П}_{\text{СПЛ}}},$$

где $\text{П}_{\text{СПЛ}+\text{МСК}/\text{МоКМ}}$ – количество пролиферирующих спленоцитов, стимулированных митогеном, в ко-культуре с МСК или МоКМ, %; $\text{П}_{\text{СПЛ}}$ – количество пролиферирующих спленоцитов, стимулированных митогеном, % [17].

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета Statistica 8.0. Проверку данных на подчинение закону нормального

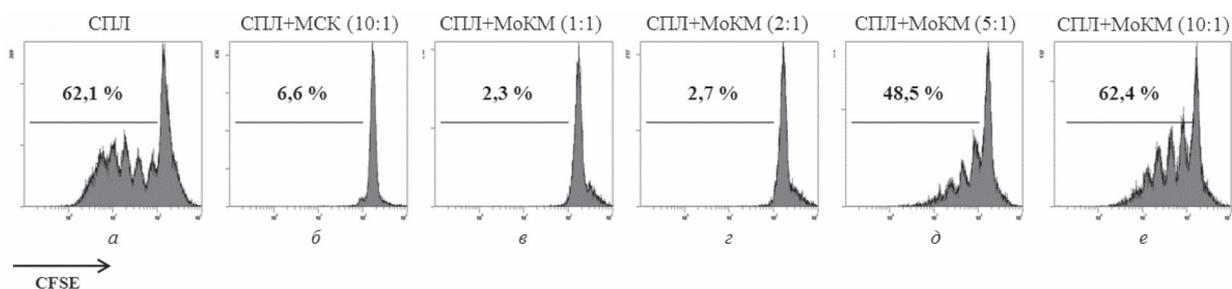


Рис. 1. Гистограммы КонА-стимулированной пролиферации спленоцитов при культивировании с МСК или с МоКМ в различных клеточных соотношениях. СПЛ – КонА-индуцированная пролиферация спленоцитов (а); СПЛ + МСК – КонА-индуцированная пролиферация спленоцитов в ко-культуре с мезенхимальными стволовыми клетками в соотношении 10:1 (б); СПЛ + МоКМ – КонА-индуцированная пролиферация спленоцитов в ко-культуре с мононуклеарными костного мозга в соотношениях 1:1 (в), 2:1 (г), 5:1 (д), 10:1 (е)

распределения выполняли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение двух групп и определение достоверности различий осуществляли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона (в случае зависимых переменных) и критерия Манна–Уитни (в случае независимых переменных). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты представляли в виде медианы (25–75-й процентиля).

Результаты и их обсуждение. Митоген-индуцированная пролиферация спленоцитов лабораторных крыс в ко-культурах с МСК и МоКМ. На рис. 1 представлены оригинальные гистограммы пролиферации митоген-стимулированных спленоцитов лабораторной крысы контрольной группы на 4-й день совместного культивирования с МСК и МоКМ, полученные методом проточной цитометрии.

При стимуляции спленоцитов КонА регистрировалась выраженная пролиферация; количество делящихся клеток составило 62,1 % (рис. 1, а). Добавление МСК приводило к резкому снижению пролиферирующих клеток до 6,6 % (рис. 1, б). В присутствии МоКМ КонА-индуцированная пролиферация спленоцитов различалась в зависимости от клеточного соотношения. Так, в ко-культурах с соотношением спленоцитов к МоКМ 1:1 и 2:1 наблюдалась выраженная супрессия клеточного деления, аналогичная эффекту МСК (соответственно 2,3 % (рис. 1, в) и 2,7 % (рис. 1, г) пролиферирующих спленоцитов). Совместное культивирование спленоцитов с МоКМ в соотношении 5:1 и 10:1 не оказывало ингибирующего влияния на митоген-стимулированную пролиферацию спленоцитов животных: 48,5 % (рис. 1, д) и 62,4 % (рис. 1, е) пролиферирующих клеток.

Результаты статистического анализа КонА-индуцированной пролиферации спленоцитов лабораторных крыс в ко-культурах с МСК или МоКМ представлены в табл. 1. Митоген-индуцированная пролиферация спленоцитов достоверно снижалась при культивировании как с МСК

Т а б л и ц а 1. Количество пролиферирующих спленоцитов в ко-культурах с МСК и МоКМ в условиях стимуляции КонА (1 мкг/мл) ($n = 15$)

Тип КонА-стимулированной клеточной культуры					
СПЛ	СПЛ + МСК (10:1)	СПЛ + МоКМ (1:1)	СПЛ + МоКМ (2:1)	СПЛ + МоКМ (5:1)	СПЛ + МоКМ (10:1)
1	2	3	4	5	6
52,7 (47,6–77,9)	5,6 (3,1–8,2)	3,1 (1,1–14,9)	3,0 (1,9–9,2)	48,2 (30,7–53,9)	62,9 (53,3–70,9)
	$p_{1-2} = 0,001$	$p_{1-3} = 0,0001$ $p_{2-3} = 0,9$	$p_{1-4} = 0,001$ $p_{2-4} = 0,73$ $p_{3-4} = 1,0$	$p_{1-5} = 0,21$ $p_{2-5} = 0,06$ $p_{3-5} = 0,03$ $p_{4-5} = 0,03$	$p_{1-6} = 0,96$ $p_{2-6} = 0,01$ $p_{3-6} = 0,007$ $p_{4-6} = 0,007$

П р и м е ч а н и е. p – уровень статистической значимости между группами. СПЛ – спленоциты, МСК – мезенхимальные стволовые клетки, МоКМ – мононуклеары костного мозга.

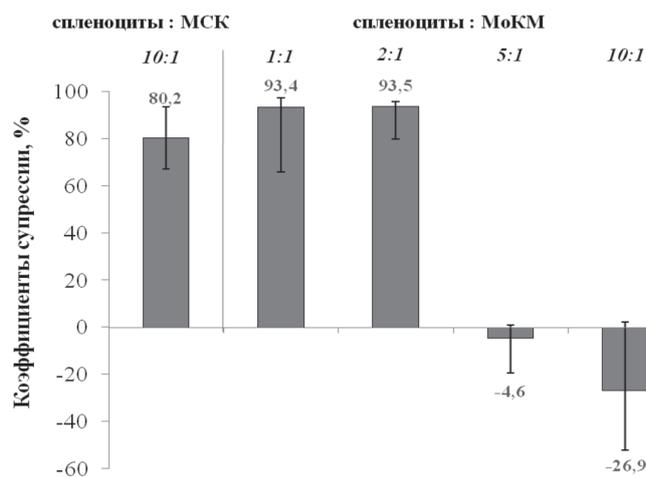


Рис. 2. Значения коэффициентов супрессии КонА-стимулированной пролиферации спленоцитов при культивировании с МСК или с МоКМ в различных клеточных соотношениях

варьировались от 67,1 до 95,6 % и статистически значимо не различались между собой. При культивировании спленоцитов с МоКМ в клеточном соотношении 5:1 и 10:1 КС митоген-индуцированной пролиферации спленоцитов принимали отрицательное значение, что свидетельствует о стимулирующем эффекте.

Результаты исследования согласуются с полученными нами ранее данными о способности МСК оказывать ингибирующее действие на митоген-/аутоантиген-стимулированную пролиферацию спленоцитов животных [18] и лимфоцитов человека [19], а также с данными других авторов [20–23]. Оптимальный ингибирующий эффект МСК наблюдался при культивировании в клеточном соотношении 10:1 (моноклеары периферической крови:МСК) [17], что подтвердилось и в отношении спленоцитов. Впервые продемонстрирована способность свежeweыделенных некультивируемых МоКМ супрессировать *in vitro* КонА-индуцируемую пролиферацию спленоцитов животных, а также определено клеточное соотношение спленоцитов и МоКМ, при котором достигается максимальный ингибирующий эффект клеточного деления (1:1 и 2:1 соответственно).

В связи с установленным *in vitro* иммуносупрессивным эффектом свежeweыделенных некультивируемых МоКМ следующим этапом являлась оценка их свойств *in vivo* в сравнительной характеристике с МСК при острой ишемической нефропатии.

КонА-индуцированная пролиферация спленоцитов лабораторных крыс с экспериментальной моделью ОИН до и после трансплантации МСК или МоКМ. Для оценки *in vivo* эффекта клеточной терапии выполнена трансплантация МСК и МоКМ лабораторным крысам с экспериментальной моделью ОИН и животным контрольной группы с последующим анализом митоген-стимулированной пролиферации спленоцитов.

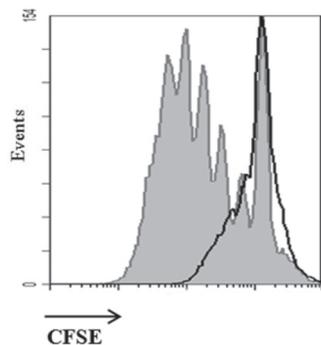


Рис. 3. Гистограммы КонА-стимулированной пролиферации спленоцитов крысы с экспериментальной ОИН (черная линия) и здоровой крысы (серая линия)

Установлено, что у крыс с ОИН уровень спленоцитов, пролиферирующих в ответ на КонА, ниже, чем у контрольных животных (рис. 3): медиана в группах составила 36,1 (34,6–50,6) и 72,8 (68,4–73,3) % ($p = 0,02$) соответственно, что отражает изменение функциональной активности иммунокомпетентных клеток при формировании ишемического процесса.

После инфузии клеточных культур выявлено статистически значимое ингибирование КонА-индуцированной пролиферации спленоцитов как у крыс с ОИН, так и у животных контрольной группы. Результаты оценки митоген-индуцируемой пролиферации спленоцитов крыс после клеточной терапии представлены в табл. 2.

Так, у животных с ОИН по сравнению с интактными крысами с ОИН доля пролиферирующих спленоцитов при стимуляции митогеном снижалась после введения МСК до 26,6 (19,7–28,2) %, а после

в соотношении 10:1, так и с МоКМ в соотношении 1:1 и 2:1. При этом статистически значимые различия в количестве пролиферирующих клеток в присутствии МСК и МоКМ в вышеуказанных культурах отсутствовали. Ко-культуры спленоцитов и МоКМ в соотношениях 5:1 и 10:1 не оказывали ингибирующего влияния на КонА-индуцируемую пролиферацию спленоцитов.

Для количественной характеристики иммуносупрессивного эффекта МСК и МоКМ на неспецифическую пролиферацию спленоцитов рассчитаны значения КС по приведенной выше формуле, которые представлены на рис. 2. КС КонА-стимулированной пролиферации спленоцитов в ко-культурах с МСК (10:1) или МоКМ (1:1 и 2:1) варьиро-

введения МоКМ – до 22,5 (4,5–43,7) % ($p < 0,05$). В контрольной группе наблюдалось аналогичное уменьшение количества пролиферирующих спленоцитов после введения как МСК, так и МоКМ ($p < 0,05$), однако общий уровень пролиферации спленоцитов оставался выше, чем в группе с ОИН. Несмотря на это, КС митоген-стимулированной пролиферации спленоцитов крыс с ОИН при трансфузии МСК составил 23,1 (21,9–61,1) %, а при трансфузии МоКМ – 37,2 (13,2–87,5) %, при этом статистически значимые различия отсутствовали (рис. 4). В группе животных контрольной группы после введения клеточных культур МСК-опосредованный КС составил 26,2 (20,7–63,5) %, МоКМ-опосредованный КС – 39,2 (35,3–54,5) %. При этом КС МСК и МоКМ статистически значимо не отличались между собой.

Таким образом, по аналогии с экспериментом *in vitro* продемонстрировано, что *in vivo* МоКМ, как и МСК, обладают иммуносупрессивным потенциалом, что подтверждается ингибированием митоген-индуцированной пролиферации спленоцитов в условиях острого ишемического повреждения почки.

В данной работе использована модель реперфузионного острого почечного повреждения у лабораторных крыс, аналогичная развитию острой почечной недостаточности у человека [24], с последующим системным введением МСК или МоКМ и сравнительной оценкой их иммуномодулирующего потенциала по отношению к пролиферации иммунокомпетентных клеток-спленоцитов. Механизмы повреждения и восстановления ткани почки при ишемии многокомпонентны [3, 5]. Ишемическое поражение почки сопровождается сужением сосудов, повреждением эндотелия и развитием воспалительного процесса с вовлечением реакций врожденного и приобретенного иммунитета [25]. В ходе развития воспалительной реакции на эпителиальных клетках повышается экспрессия толл-подобных рецепторов (TLRs, toll-like receptors), которые распознают поврежденные компоненты ткани, инициируются активация и созревание дендритных клеток, активация наивных Т-лимфоцитов и продукция цитокинов интерлейкина-12 (ИЛ-12), γ -интерферона (γ -ИФН), повышается экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС, major histocompatibility complex) II класса [26, 27]. Клетки тубулярного эпителия также синтезируют провоспалительные цитокины и хемокины: фактор некроза опухоли α (ФНО α), моноцитарный хемотаксический фактор (MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1), ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-1 β , трансформирующий ростовой фактор β (ТРФ β) и др. [28]. Кроме того, возрастание уровней активных форм кислорода и азота приводит к развитию оксидативного стресса [29]. В совокупности продукция медиаторов воспаления, вазоактивных факторов и формирование воспалительных клеточных инфильтратов препятствуют восстановлению ткани в постишемический период [25].

В ряде экспериментальных работ по оценке терапевтической эффективности показано, что МСК могут участвовать в восстановлении почечной ткани независимо от их дифференцировки. Они способны также мигрировать в поврежденную ткань и синтезировать различные биологически активные молекулы (цитокины, ростовые факторы, хемокины и др.), экспрессировать ряд ферментов, взаимодействовать с иммунокомпетентными и другими клетками, предотвращая развитие воспалительной реакции и обеспечивая защиту ткани от повреждения [7, 30, 31]. Кроме того, среди ренопротективных механизмов МСК, которые индивидуально или синергично индуцируют функциональное восстановление, выделяют также инициацию клеточного репрограммирования, ангиогенез, стимуляцию эндогенных клеток-предшественников, антиапоптотическое антифиброгенное и антиоксидантное действие [32].

Таким образом, установлено, что МоКМ, как и МСК, обладают выраженным иммуномодулирующим потенциалом, заключающимся в ингибировании пролиферации спленоцитов живот-

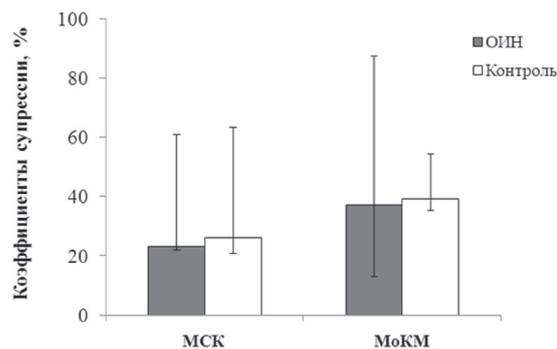


Рис. 4. Значения коэффициентов супрессии КонА-стимулированной пролиферации спленоцитов крысы с экспериментальной ОИН и здоровых животных после инфузии культур МСК или МоКМ

ных. Известно, что костный мозг здоровой крысы включает около 44 % миелоидных клеток, 36 % эритроидных клеток, 19 % лимфоцитов и 0,4 % плазматических клеток. Несмотря на то что МСК представляют собой минорную популяцию клеток костного мозга (частота встречаемости 0,01–0,001 %), синергичный эффект на их функциональную активность может оказывать широкий спектр цитокинов и ростовых факторов, синтезируемых другими клетками (гемопоэтические стволовые клетки, гемопоэтические клетки-предшественники, эндотелиальные клетки, адипоциты, макрофаги, моноциты, лимфоциты, нейтрофилы и тромбоциты). Кроме того, иммуномодулирующими свойствами среди основных популяций клеток костного мозга наряду с МСК могут обладать также регуляторные $CD4^+CD25^+$ Т-клетки, которые составляют треть от $CD4^+$ Т-лимфоцитов, и дендритные клетки с противовоспалительным М2-фенотипом [33].

Заключение. Свежевыделенные некультивируемые МоКМ оказывают выраженное *in vitro* и *in vivo* антипролиферативное действие на Кона-стимулированные спленциты крыс с экспериментальной моделью ОИН, сопоставимое с иммуносупрессивным действием МСК. Максимальный *in vitro* супрессивный эффект МоКМ на митоген-индуцированную пролиферацию спленцитов наблюдается при ко-культивировании со спленцитами в соотношениях 1:1 и 2:1 (спленциты:МоКМ). Учитывая полученные результаты, можно предположить, что помимо противовоспалительного действия свежевыделенные некультивированные МоКМ могут обладать и другими свойствами, присущими МСК. Это открывает перспективу применения МоКМ в терапии острых состояний с воспалительным компонентом для предотвращения отдаленных последствий ишемического поражения органов.

Список использованной литературы

1. Пилотович, В. С. Хроническая болезнь почек. Методы заместительной почечной терапии / В. С. Пилотович, О. В. Калачик. – М.: Мед. лит-ра, 2009. – 288 с.
2. Ермоленко, В. М. Острая почечная недостаточность / В. М. Ермоленко, А. Ю. Николаев. – М.: Гэотар-Медиа, 2010. – 240 с.
3. Non-special management of acute renal failure / P. E. Stevens [et al.] // QJM. – 2011. – Vol. 94, N 10. – P. 533–540.
4. Imai, E. The continuing story of renal repair with stem cells / E. Imai, H. Iwatami // J. Am. Soc. Nephrol. – 2007. – Vol. 18, N 9. – P. 2423–2424.
5. Wise, A. F. Mesenchymal stem cells in kidney inflammation and repair / A. F. Wise, S. D. Ricardo // Nephrology. – 2012. – Vol. 17. – P. 1–10.
6. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells / L. Meirelles [et al.] // Cytokine Growth Factor Rev. – 2009. – Vol. 20. – P. 419–427.
7. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanism / F. Tegel [et al.] // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2005. – Vol. 289, N 1. – P. 31–42.
8. Safety of Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application / Y. Wang [et al.] // Stem Cells Inter. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 652034.
9. Rombouts, W. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture / W. Rombouts, R. Ploemacher // Leukemia. – 2003. – Vol. 17, N 1. – P. 160–170.
10. Role of whole bone marrow, whole bone marrow cultured cells, and mesenchymal stem cells in chronic wound healing / S. Shareef [et al.] // Stem Cell Res. & Ther. – 2015. – N 6. – P. 24.
11. Bone marrow mononuclear cells and acute myocardial infarction / S. Arnous [et al.] // Stem Cell Res. Ther. – 2012. – Vol. 3, N 1. – P. 2.
12. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy / R. Mendez-Otero [et al.] // Regen. Med. – 2007. – N 2. – P. 417–423.
13. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats / A. Giraldi-Guimarães [et al.] // Brain Res. – 2009. – N 1266. – P. 108–120.
14. Intravenous autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke / S. Savitz [et al.] // Ann. Neurol. – 2011. – N 70. – P. 59–69.
15. Restoration of intracortical and thalamocortical circuits after transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into the ischemic brain of mice / M. Song [et al.] // Cell Transplant. – 2013. – Vol. 22, N 11. – P. 2001–2015.
16. Therapeutic efficacy of bone marrow-derived mononuclear cells in diabetic polyneuropathy is impaired with aging or diabetes / M. Kondo [et al.] // J. Diabetes Invest. – 2015. – Vol. 6, N 2. – P. 140–149.
17. In vitro assessment of mesenchymal stem cells immunosuppressive potential in multiple sclerosis patients / M. Zafranskaya [et al.] // Immunol. Lett. – 2013. – Vol. 149. – P. 9–18.
18. Иммуносупрессивный потенциал мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом при кокультивировании с митоген/миелин-стимулированными спленцитами / М. М. Зафранская [и др.] // Медицина. – 2010. – Т. 70, № 3. – С. 85–88.

19. Механизмы антипролиферативного действия мезенхимальных стволовых клеток у пациентов с рассеянным склерозом / М. М. Зафранская [и др.] // Мед. иммунол. – 2011. – Т. 13, № 2–3. – С. 237–246.
20. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide / M. Krampera [et al.] // Blood. – 2003. – N 101. – P. 3722–3729.
21. The therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by peripheral and central mechanisms / S. Morando [et al.] // Stem. Cell. Res. Ther. – 2012. – Vol. 3, N 1. – P. 3.
22. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis / J. Auletta [et al.] // Immunotherapy. – 2012. – Vol. 4, N 5. – P. 529–547.
23. *English, K.* Mesenchymal stromal cells; role in tissue repair, drug discovery and immune modulation / K. English, B. P. Mahon, K. J. Wood // Curr. Drug. Deliv. – 2014. – Vol. 11, N 5. – P. 561–571.
24. *Lieberthal, W.* Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury / W. Lieberthal, J. Levine // Am. J. Physiol. – 1996. – Vol. 271. – P. F477–F488.
25. *Basile, D. P.* The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function / D. P. Basile // Kidney Int. – 2007. – Vol. 72, N 2. – P. 151–156.
26. Kidney-derived mesenchymal stromal cells modulate dendritic cell function to suppress alloimmune responses and delay allograft rejection / Y. Huang [et al.] // Transplantation. – 2010. – N 90. – P. 1307–1311.
27. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury / L. Li [et al.] // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178, N 9. – P. 5899–5911.
28. *Wynn, T. A.* Cellular and molecular mechanisms of fibrosis / T. A. Wynn // J. Pathol. – 2008. – Vol. 214. – P. 199–210.
29. Original article anti-oxidant pathways are stimulated by mesenchymal stromal cells in renal repair after ischemic injury / H. Liu [et al.] // Cytotherapy. – 2012. – Vol. 14. – P. 162–172.
30. *Chen, Y.* Adipose-derived mesenchymal stem cells protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction / Y. Chen, C. Sun, Y. Lin // J. Transplant. Med. – 2011. – Vol. 9. – P. 51–70.
31. Mesenchymal stem cells attenuate ischemic acute kidney injury by inducing regulatory T cells through splenocyte interactions / J. Hu [et al.] // Kidney Int. – 2013. – Vol. 84. – P. 521–531.
32. Comparison of uncultured marrow mononuclear cells and culture-expanded mesenchymal stem cells in 3d collagen-chitosan microbeads for orthopedic tissue engineering / J. Wise [et al.] // Tissue Engineering. A. – 2014. – Vol. 20, N 1–2. – P. 210–224.
33. Bone marrow and the control of immunity / E. Zhao [et al.] // Cell. Mol. Immunol. – 2012. – N 9. – P. 11–19.

Поступила в редакцию 21.09.2015