

ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ, ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПОСТНАТАЛЬНЫМИ ММСК ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ В УСЛОВИЯХ ИХ *IN VITRO* СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ИММУНОИЗОЛИРОВАННЫМИ β -КЛЕТКАМИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Гончаров А.Г., Шуплецова В.В., Тодосенко Н.М., Гончарова Е.А.,
Литвинова Л.С.

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Резюме. В статье приведены результаты оценки продукции культурами мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток ростовых факторов, про- и противовоспалительных цитокинов, в условиях сокультивирования с иммуноизолированными β -клетками поджелудочной железы. Трансплантация β -клеток является минимально инвазивным терапевтическим подходом (по сравнению с трансплантацией всей поджелудочной железы) и обеспечивает лучший метаболический контроль в отношении введения инсулина. Однако при пересадке β -клеток всегда существует риск иммунного отторжения трансплантата. Общеизвестно, что инкапсуляция является эффективным средством иммунологической защиты от иммунной системы реципиента при трансплантации. Решающее значение для лечения сахарного диабета первого типа имеет регуляция аутоиммунного ответа на трансплантируемые клетки. В последние годы, наряду с заменой островковых клеток, для коррекции сахарного диабета большое внимание уделяется использованию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, обладающих иммуномодулирующими и/или иммуносупрессивными свойствами. *In vitro* и *in vivo* они оказывают влияние не только на Т-лимфоциты, но также на В-лимфоциты, дендритные и НК-клетки. Мезенхимальные стволовые клетки способны ингибировать пролиферацию иммунных клеток и снижать их секрецию воспалительных цитокинов, они могут действовать как вспомогательные клетки для улучшения выживаемости островков на ранней посттрансплантационной фазе. Совместная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток с β -клетками поджелудочной железы является многообещающей перспективой лечения сахарного диабета первого типа, а более глубокое изучение механизмов, обуславливающих их цитопротективное действие на трансплантат, может помочь в реализации данного терапевтического подхода и улучшить его эффективность. В исследовании для создания иммуноизолирующих скаффолдов использовали 1%-ный раствор альгината натрия низкой вязкости с добавлением физиологического раствора (натрия хлорид 0,9%),

Адрес для переписки:

Гончаров Андрей Геннадьевич
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»
236010, Россия, г. Калининград, пр. Победы, 189, кв. 15.
Тел.: 8 (911) 865-20-66.
E-mail: agoncharov59@mail.ru

Address for correspondence:

Goncharov Andrey G.
Immanuel Kant Baltic Federal University
236010, Russian Federation, Kaliningrad, Pobedy ave.,
189, apt 15.
Phone: 7 (911) 865-20-66.
E-mail: agoncharov59@mail.ru

Образец цитирования:

А.Г. Гончаров, В.В. Шуплецова, Н.М. Тодосенко,
Е.А. Гончарова, Л.С. Литвинова «Оценка продукции
ростовых факторов, про- и противовоспалительных
цитокинов постнатальными ММСК из различных
тканевых источников в условиях их *in vitro*
сокультивирования с иммуноизолированными
 β -клетками поджелудочной железы» // Российский
иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 4. С. 477-482.
doi: 10.46235/1028-7221-1058-POG

© Гончаров А.Г. и соавт., 2021

For citation:

A.G. Goncharov, V.V. Shupletsova, N.M. Todosenko,
E.A. Goncharova "Production of growth factors, pro – and
anti-inflammatory cytokines by postnatal MMSCs from various
tissue sources during *in vitro* co-cultivation with immuno-
isolated pancreatic β -cells", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 4,
pp. 477-482.

doi: 10.46235/1028-7221-1058-POG

DOI: 10.46235/1028-7221-1058-POG

для полимеризации добавляли 2,2%-ный раствор $BaCl_2$. В системах сокультивирования β -клеток с стволовыми клетками костномозгового происхождения и полученных из подкожной жировой клетчатки регистрировалось снижение продукции провоспалительных цитокинов ($TNF\alpha$, IL-12, IL-5) и ростового фактора GM-CSF. Противовоспалительная активность была более ярко выражена у стволовых клеток адипозного происхождения и показаны их иммуномодулирующие эффекты путем изменения цитокин-продуцирующей активности. Показано, что мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани и костного мозга, оказывают цитопротективное действие на β -клетки поджелудочной железы путем изменения цитокин-продуцирующей активности в сторону противовоспалительного профиля.

Ключевые слова: инсулин-продуцирующие клетки, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, сокультивирование, сахарный диабет 1-го типа, провоспалительные цитокины, противовоспалительные цитокины, ростовые факторы

PRODUCTION OF GROWTH FACTORS, PRO – AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES BY POSTNATAL MMSCs FROM VARIOUS TISSUE SOURCES DURING *IN VITRO* CO-CULTIVATION WITH IMMUNO-ISOLATED PANCREATIC β -CELLS

Goncharov A.G., Shupletsova V.V., Todosenko N.M., Goncharova E.A.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. The article presents the results of evaluating growth factors, pro – and anti-inflammatory cytokine production by multipotent mesenchymal stem cell cultures under the conditions of co-cultivation with immuno-isolated beta-cells of the pancreas. β -cell transplantation is a minimally invasive therapeutic approach (compared to transplantation of entire pancreas), and it provides better metabolic control with respect to insulin administration. However, when transplanting β -cells, there is always a risk of immune rejection of the grafted cells. It is generally recognized that encapsulation is an effective means of immunological protection against the recipient's immune system during transplantation. Regulation of the autoimmune response to transplanted cells is crucial for the treatment of type I diabetes mellitus. In recent years, along with replacement of islet cells, much attention has been paid to the use of multipotent mesenchymal stem cells with immunomodulatory and/or immunosuppressive properties, aimed for the correction of diabetes mellitus. Either *in vitro* and *in vivo*, they impact not only T-lymphocytes, but also B-lymphocytes, dendritic and NK-cells. Mesenchymal stem cells are able to inhibit proliferation of immune cells and reduce their secretion of inflammatory cytokines, acting as auxiliary cells to improve the survival of islets in the early post-transplant phase. Combined transplantation of multipotent mesenchymal stem cells and pancreatic β -cells is a promising approach to the treatment of type I diabetes mellitus. Deeper study of the mechanisms that cause their cytoprotective effect upon the transplant may be helpful for implementation of this therapeutic approach and improve its efficiency. In our study, a 1% solution of low-viscosity sodium alginate with addition of saline solution (0.9% sodium chloride) was used to create immuno-insulating scaffolds, and a 2.2% $BaCl_2$ solution was added for polymerization. Decreased production of proinflammatory cytokines ($TNF\alpha$, IL-12, IL-5) and growth factor (GM-CSF) was registered in co-cultures of β -cells with mesenchymal stem cells of bone marrow origin, and those obtained from subcutaneous adipose tissue. Anti-inflammatory activity was more pronounced in adipose stem cells and their immunomodulatory effects were shown via changes of their cytokine-producing activity. Hence, the multipotent mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue and bone marrow have shown to exert cytoprotective effect upon pancreatic beta-cells by shifting the cytokine-producing activity towards an anti-inflammatory profile.

Keywords: insulin-producing cells, mesenchymal stem cells, co-culture, type I diabetes mellitus, proinflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, growth factors

Введение

Трансплантация β -клеток является минимально инвазивным терапевтическим подходом (по сравнению с трансплантацией всей поджелудочной железы) и обеспечивает лучший метаболический контроль в отношении введения инсулина. Однако при пересадке β -клеток всегда существует риск иммунного отторжения трансплантата [4]. Общеизвестно, что инкапсуляция является эффективным средством иммунологической защиты от иммунной системы реципиента при трансплантации. Решающее значение для лечения сахарного диабета первого типа (СД1) имеет регуляция аутоиммунного ответа на трансплантируемые клетки. В последние годы, наряду с заменой островковых клеток, для коррекции сахарного диабета большое внимание уделяется использованию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), обладающих иммуномодулирующими и/или иммуносупрессивными свойствами [5]. *In vitro* и *in vivo* они оказывают влияние не только на Т-лимфоциты, но также на В-лимфоциты, дендритные (ДК) и НК-клетки [1, 5]. ММСК способны ингибировать пролиферацию иммунных клеток и снижать их секрецию воспалительных цитокинов [2]. Вышеупомянутые особенности ММСК предполагают, что они могут действовать как вспомогательные клетки для улучшения выживаемости островков на ранней посттрансплантационной фазе [3]. Совместная трансплантация ММСК с β -клетками поджелудочной железы является многообещающей перспективой лечения СД1, а более глубокое изучение механизмов, обуславливающих цитопротективное действие ММСК на трансплантат, может помочь в реализации данного терапевтического подхода и улучшить его эффективность.

Цель исследования — оценить продукцию культурами ММСК ростовых факторов, про- и противовоспалительных цитокинов в условиях сокультивирования с иммуноизолированными β -клетками.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили клеточные культуры ММСК костного мозга, жировой ткани и β -клеток поджелудочной железы, полученные из биоптатов тканей крыс стока Wistar, умерщвленных путем цервикальной дислокации спинного мозга под наркозом диэтилового эфира. Все работы проводились в соответствии с правилами работы с лабораторными животными и биоэтическими нормами. Для подтверждения принадлежности полученных ММСК костного

мозга (ММСК_{км}) и жировой ткани (ММСК_{жт}) крыс к данному фенотипу клеток проводили оценку их дифференцировочного потенциала в остео- и адипогенном направлении, с последующим окрашиванием ализариновым красным (остеобласты) и масляным красным (адипоциты). Для подтверждения принадлежности выделенных инсулин-продуцирующих (ИПК) β -клеток поджелудочной железы крысы к данному фенотипу клеток, наряду с морфологической оценкой, осуществлялась оценка экспрессии мРНК гена проинсулина (*Ins1*), маркера зрелых β -клеток поджелудочной железы. Жизнеспособность, а также количественные показатели состояния культур определяли при помощи автоматического счётчика Countess TM Automated Cell Counter (Invitrogen, США) с использованием красителя Trypan blue 0,4% (Invitrogen, США).

Первичные культуры ИПК, ММСК_{жт} и ММСК_{км} культивировали до 2-3 пассажей (10-14 дней). Затем клетки инкапсулировали в альгинатные капсулы. Для инкапсулирования использовали 1%-ный раствор альгината натрия низкой вязкости с добавлением физиологического раствора (натрия хлорид 0,9%), для полимеризации добавляли 2,2%-ный раствор CaCl_2 (Sigma, США). В исследовании были адаптированы следующие экспериментальные клеточные системы:

№ 1: инкапсулированные монокультуры ИПК;

№ 2: инкапсулированные монокультуры ММСК_{жт};

№ 3: инкапсулированные монокультуры ММСК_{км};

№ 4: инкапсулированные в альгинатных капсулах ИПК сокультивированные с адгезированными на пластике ММСК_{жт} (ИПК + ММСК_{жт}).

№ 5: инкапсулированные в альгинатных капсулах ИПК сокультивированные с адгезированными на пластике ММСК_{км} (ИПК + ММСК_{км}).

Системы сокультивирования № 1-3 использовали в качестве контрольных монокультур для оценки функциональных и молекулярно-генетических изменений в экспериментальных системах № 4 и № 5. Культивирование (в течение 48 часов) ММСК и ИПК в эксперименте осуществлялось в среде DMEM с L-глутамином, с высоким содержанием глюкозы 4,0 г/л (Sigma, США), все остальные добавки соответствовали стандартному протоколу.

Деполимеризация альгинатного покрытия осуществлялась обработкой раствором, содержащим 55Мм ЭДТА (Sigma, США) с добавлением 10 мМ HEPES с последующим центрифугированием (5 минут, 1000 об/мин). С помощью

метода проточной флуориметрии проводили количественное определение про- и противовоспалительных цитокинов (IL-13, IL-12, IL-5, IL-10, GM-CSF, TNF α) в супернатантах исследуемых клеточных систем на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex[®] 200 Systems, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-Plex Pro Rat Cytokine, Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение

При исследовании систем № 1,2,3 (ИПК ММСКжт, ММСКкм) в отношении продукции цитокинов было установлено, что инкапсуляция не подавляла функциональную активность данных культур. Количество ростового фактора GM-CSF в супернатантах системы сокультивирования 4 (ИПК + ММСКжт) уменьшалось примерно в 2 раза относительно монокультуры ММСКжт и достигало значения 15,58 пг/мл после 48 часов инкубирования. В системе сокультивирования 5 (ИПК с ММСКкм) после 48 часов инкубирования также происходило уменьшение количества GM-CSF в 1,5 раза (19,21 пг/мл) относительно монокультуры ММСКкм. Наиболее низкие уровни данного ростового фактора регистрировали в системе сокультивирования с ММСКкм после 48 часов. Также зарегистрировано снижение цитокинпродуцирующей активности ММСКжт и ММСКкм в отношении TNF α , при сокультивировании с инсулин-продуцирующими клетками. В супернатантах системы сокультивирования 4 (ИПК + ММСКжт) было выявлено снижение количества данного цитокина в 2,5 раза (0,32 пг/мл) относительно монокультуры ММСКжт после 48 часов инкубирования. Аналогично, количество TNF α в супернатантах системы сокультивирования 5 (ИПК с ММСКкм) также снижалось в 2,3 раза относительно аналогичных значений монокультуры ММСКкм. Выявлено повышение концентрации провоспалительного цитокина – IL-12 в системе сокультивирования 4 (ИПК + ММСКжт) после 48 часов инкубирования. Так, количество IL-12 в системе сокультивирования ИПК с ММСКжт возрастало в 1,7 раз (0,47 пг/мл) относительно монокультуры ММСКжт. Напротив, в супернатантах систем сокультивирования 5 (ИПК с ММСКкм) происходило уменьшение содержания данного цитокина в 2 раза относительно контрольной монокультуры 3 (ММСКкм).

В целом установлено, что в системе сокультивирования 4 уровень IL-12 был статистически значимо выше (в 2 раза) такого в системе со-

культивирования 5. Количество противовоспалительного цитокина IL-10 в супернатантах систем сокультивирования инсулин-продуцирующих клеток с ММСКжт увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с монокультурой ММСКжт. Напротив, в системе сокультивирования 5 регистрировалось уменьшение концентрации IL-10 почти в 2 раза (1,88 пг/мл) относительно монокультуры ММСКкм. В целом при сравнении систем сокультивирования было зарегистрировано, что количество IL-10 в системе с ММСКжт статистически значимо превышало (в 2,3 раза) такое в системе сокультивирования 5. Содержание IL-5 значимо не различалось между монокультурами ИПК и системами сокультивирования ИПК с ММСК костного мозга и жировой ткани. Однако наблюдалось небольшое понижение концентрации в системах сокультивирования ИПК с ММСК относительно контрольных монокультур ММСК. Исследование супернатантов клеточных систем установило наличие следового содержания IL-13. Тем не менее зарегистрировано небольшое повышение концентрации в системе сокультивирования ИПК с ММСКжт относительно монокультуры ММСКжт. В остальных клеточных культурах количество IL-13 оставалось неизменным.

Как уже упоминалось ранее, ММСК обладают иммуномодулирующими и/или иммуносупрессивными свойствами. Эти особенности ММСК предполагают, что они могут действовать как вспомогательные клетки для улучшения выживаемости β -клеток поджелудочной железы на ранней посттрансплантационной фазе. В обеих системах сокультивирования ИПК с ММСКкм и ММСКжт регистрировалось снижение продукции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-12, IL-5) и ростового фактора GM-CSF. Противовоспалительная активность была более ярко выражена у ММСК жировой ткани. Таким образом, согласно нашим данным, ММСК жировой ткани и костного мозга оказывают цитопротективное действие на β -клетки поджелудочной железы путем изменения цитокин-продуцирующей активности, в сторону противовоспалительного профиля. Совместная трансплантация ММСК с β -клетками поджелудочной железы является многообещающей перспективой лечения СД 1-го типа, а более глубокое изучение механизмов, обуславливающих цитопротективное действие ММСК на трансплантат, может помочь в реализации данного терапевтического подхода и улучшить его эффективность.

Список литературы / References

1. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.*, 2003, no. 31, pp. 890-896.
2. Lee P.H., Kim J.W., Bang O.Y., Ahn Y.H., Joo I.S., Huh K. Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2008, no. 83, pp. 723-730.
3. Rasmussen J.G., Frobert O., Holst-Hansen C., Kastrup J., Baandrup U., Zachar V., Fink T., Simonsen U. Comparison of human adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in a myocardial infarction model. *Cell Transplant.*, 2014, no. 23, pp. 195-206.
4. Remuzzi A., Cornolti R., Bianchi R., Figliuzzi M., Porretta-Serapiglia C., Oggioni N., Carozzi V., Crippa L., Avezza F., Fiordaliso F., Salio M., Lauria G., Lombardi R., Cavaletti G. Regression of diabetic complications by islet transplantation in the rat. *Diabetologia*, 2009, no. 52, pp. 2653-2661.
5. Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G., Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 2005, no. 106, pp. 1755-1761.

Авторы:

Гончаров А.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия
Шуплецова В.В. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия
Тодосенко Н.М. — к.б.н., научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Goncharov A.G., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation
Shupletsova V.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation
Todosenko N.M., PhD (Biology), Research Associate, Center for Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Гончарова Е.А. — студентка медицинского института
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Goncharova E.A., Student, Medical Institute, Immanuel Kant
Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Литвинова Л.С. — д.м.н., директор Центра
иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО
«Балтийский федеральный университет имени
Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Center for
Immunology and Cell Biotechnologies, Professor, Immanuel
Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian
Federation

Поступила 16.07.2021
Принята к печати 20.08.2021

Received 16.07.2021
Accepted 20.08.2021