

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА И ПРОРЕГЕНЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ (МВ), ПРОДУЦИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ (МСК) В МОДЕЛИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ОПН) МЫШЕЙ

© 2019 г. Т. С. Хабалова*, Э. А. Кащенко, Г. В. Селедцова

*E-mail: khabalovat@gmail.com

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 29.03.2019

Целью работы стало изучить иммунорегуляторные свойства МВ, продуцируемых МСК и их вклад в прорегенераторное действие МВ на почечную ткань. Эксперименты проведены на линейных мышцах C57Bl6 возрастом 3–4 месяца. Острую почечную недостаточность (ОПН) индуцировали однократным введением 50% глицерола. Мезенхимальные стволовые клетки получали из костного мозга здоровых животных, культивировали в стандартных условиях. Микровезикулы (МВ) получали путем центрифугирования при 10000 g супернатанта МСК после индукции апоптоза путем культивирования в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение суток. Показано, что МВ оказывают положительный эффект на восстановление выделительной функции почек на уровне, сопоставимом с эффектом, оказываемым МСК. Использование МСК и МВ в лечении ОПН приводило практически к одинаковому результату: на 4-е сутки уровень мочевины составил 9,3 мг/мл и 9,37 мг/мл соответственно, что на 25% ниже, чем в глицерол-контроле. К 8-м суткам уровень мочевины составил 7,9 мг/мл после введения МСК и 7,6 мг/мл после введения МВ, что на 21% ниже, чем в глицерол-контроле. Показано, МВ, продуцируемые МСК, дозозависимо стимулируют пролиферацию как спленоцитов, так и клеток почечной ткани. Для исследования устойчивости к апоптозу, использовали спленоциты как от интактных мышей, так и от мышей с глицерол-индуцированной ОПН. Добавление МВ вызывает снижение уровня апоптоза как у интактных мышей (21,73%) так и мышей с ОПН (13,28%). Соответственно, обратно-пропорционально, увеличивался процент клеток, находящихся в S/M фазе клеточного цикла.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК), микровезикулы (МВ), острая почечная недостаточность (ОПН)

DOI: 10.31857/S102872210006505-0

Адрес: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория клеточных биотехнологий, Селедцова Галина Викторовна.

Тел.: (383) 222 26 74, факс: (383) 222 70 28

E-mail: niiki01@online.nsk.su

Авторы:

Хабалова Т. С., аспирант, лаборант-исследователь лаборатории клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Кащенко Э. А., к. м. н., научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Селедцова Г. В., д. м. н., заведующая лабораторией клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

За последние несколько лет было показано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) осуществляют цитопротективное действие стимулирующей эндогенной регенерацией резидентных клеток, а не процессами хоминга и дифференцировки [1]. Одним из механизмов подобного действия могут быть внеклеточные везикулы (эк-

зосомы и микровезикулы), которые сохраняют свойства клеток, из которых были получены [2]. Кроме того, МСК обладают иммунорегуляторными свойствами [3], которыми могут обладать и продуцируемые МСК МВ, но данный вопрос остается неизученным.

Целью работы было исследование иммунорегуляторных свойств МВ, продуцируемых МСК и их вклад в прорегенераторное действие МВ на почечную ткань.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на линейных мышах линии С57В16 возрастом 3–4 месяца. Острую почечную недостаточность индуцировали однократным внутримышечным введением 50% глицерола в дозе 8.6 мг/кг.

Мезенхимальные стволовые клетки были получены из костного мозга сингенных мышей С57В16 методом адгезии к культуральному пластику. Клетки культивировали в стандартных условиях.

После достижения монослоя, часть МСК подвергали апоптозу путем культивирования в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение 1 суток. Через 24 часа супернатант центрифугировали при 2000 g в течение 15 минут для удаления клеточного дробиса. Надосадок дополнительно центрифугировали при 10000 g в течение 60 минут при 4 °С. Полученный в итоге осадок ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора. Для стандартизации суспензии МВ, определяли содержание белка по методу Брэдфорда.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Использование МСК и МВ приводило практически к одинаковому результату: на 4-е сутки уровень мочевины составил 9,3 мкг/мл и 9,37 мкг/мл соответственно, что на 25% ниже, чем в глицерол-контроле 12,43 мкг/мл (у интактных мышей – 6,59 мкг/мл). К 8-м суткам уровень мочевины составил 7,9 мкг/мл после введения МСК и 7,6 мкг/мл после введения МВ, что на 21% ниже, чем в глицерол-контроле 9,64 мкг/мл. Уровень пролиферации спленоцитов в тесте с ³H-тимидином составил 118 имп/мин, КонА-стимулированная пролиферация составила 1208 имп/мин. В присутствии МВ в дозе 10 мкг/мл пролиферативная способность спленоцитов увеличилась почти в 3 раза (342 имп/мин – спонтанная, 3889 имп/мин – КонА-стимулированная). МВ в дозе 30 мкг/мл: 475 имп/мин – спонтан-

ная и 4667 имп/мин – КонА-стимулированная; 492 имп/мин – спонтанная и 5012 имп/мин – КонА-стимулированная при добавлении МВ в дозе 90 мкг/мл. Добавление МВ в культуральную среду на 3 суток в дозе 10 мкг/мл повышало пролиферацию почечных эпителиоцитов (ПЭ) в 4 раза (254 имп/мин против 65 имп/мин в контроле). Увеличение дозы МВ также повышало пролиферацию ПЭ: 337 имп/мин при дозе МВ 30 мкг/мл и 392 имп/мин при дозе МВ 90 мкг/мл. Влияние МВ на апоптогенное действие доксорубина на спленоциты определяли в тесте с окраской пропидиум иодидом. Интересно, что сама по себе индукция ОПН вызывает уменьшение апоптозных спленоцитов почти в 2 раза (16,3% против 29,17% у интактных мышей). Добавление МВ вызывает снижение уровня апоптоза как у интактных мышей (21,73%) так и мышей с ОПН (13,28%).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, полученные в результате эксперимента *in vivo* результаты показали, что внутривенное введение как МСК, так и МВ, продуцируемых МСК, в одинаковой степени приводит к более раннему восстановлению выделительной функции почек после глицерол-индуцированной ОПН. Это говорит о том, что про-регенераторное действие МСК в значительной степени, если не полностью, обусловлено продуцируемыми ими микровезикулярными частицами. Указанное действие МВ подтверждается результатами *in vitro* – продуцируемые МСК микровезикулярные частицы усиливали пролиферацию ПЭ, причем при увеличении дозы МВ это влияние усиливалось. Аналогичное действие МВ оказывают на клетки иммунной системы: *in vitro* отмечается дозозависимое усиление пролиферации спленоцитов и увеличение их устойчивости к влиянию апоптогенных факторов. То есть продуцируемые МСК микровезикулярные частицы оказывают иммуностимулирующее действие. Этот результат противоречит литературным данным, что при ОПН, независимо от генеза, наблюдается активация иммунной системы, приводящая к усилению повреждения и про-регенераторное действие МСК обусловлено их иммуносупрессорным действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Morigi M., Rota C., Remuzzi G. Mesenchymal stem cells in kidney repair. *Methods Mol Biol.* 2016, 1416, 89–107.

2. Gatti S., Bruno S., Deregibus M. C., Sordi A., Cantaluppi V., Tetta C., Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia–reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011, 26, 1474–1483.
3. Castro-Manreza M. E., Montesinos J. J. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: biological aspects and clinical applications. *J. Immunol Res.* 2015, 2015, 394917.

EFFECT OF TRANSPLANTATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC) AND PRODUCED MICROVESICLES (MV) ON THE MAINTENANCE OF MEMORY T-CELLS AND T-REGULATORY CELLS IN THE MODEL ACUTE RENAL FAILURE IN MICE

© 2019 T. S. Khabalova*, E. A. Kaschenko, G. V. Seledtsova

*E-mail: khabalovat@gmail.com

Federal State Budget Scientific Institution “Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology” (SRIFCI). Novosibirsk, Russia

Received: 14.03.2019. **Accepted:** 29.03.2019

MV has been shown to have a positive effect on the restoration of renal excretory function at a level comparable to the effect of MSCs. The use of MSC and MB in the treatment of acute renal failure resulted in almost the same result: on the 4th day the level of urea was 9.3 µg/ml and 9.37 µg/ml, respectively, which is 25% lower than in the glycerol control. By the 8th day, the level of urea was 7.9 µg/ml after the introduction of MSC and 7.6 µg/ml after the introduction of MB, which is 21% lower than in the glycerol control. It has been shown that the MW produced by MSCs stimulate the proliferation of both splenocytes and cells of the kidney tissue in a dose-dependent manner. To study the resistance to apoptosis, splenocytes were used both from intact mice and from glycerol-induced ARF. The addition of MB causes a decrease in the level of apoptosis in both intact mice (21.73%) and mice with ARF (13.28%). Accordingly, inversely, the percentage of cells in the S / M phase of the cell cycle increased.

Key words: mesenchymal stem cells (MSC), microvesicles (MV), acute renal failure (ARF)

Authors:

Khabalova T. S., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms Head of the Laboratory of Cell Biotechnology, Federal State Budget Scientific Institution “Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology” (SRIFCI). Novosibirsk, Russia;

Kaschenko E. A., Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms Head of the Laboratory of Cell Biotechnology, Federal State Budget Scientific Institution “Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology” (SRIFCI). Novosibirsk, Russia;

Seledtsova G. V., ☒ PhD, Head, Leading Reseacher of Cell Biotechnology Laboratory, Federal State Budget Scientific Institution “Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology” (SRIFCI). Novosibirsk, Russia. **E-mail:** niiki01@online.nsk.su