

МЕХАНИЗМЫ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Зафранская М.М.¹, Нижегородова Д.Б.¹, Юркевич М.Ю.¹,
Багатка С.С.¹, Иванчик Г.И.¹, Мотузова Я.М.²,
Федулов А.С.²

¹ Иммунологическая группа, Центральная научно-исследовательская лаборатория, Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

² Белорусский государственный медицинский университет, кафедра нервных и нейрохирургических болезней, г. Минск

Резюме. Изучена способность аутологичных и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток ранних пассажей, выделенных из костного мозга пациентов с рассеянным склерозом, ингибировать пролиферацию митоген/миелин-стимулированных Т-клеток памяти. Установлено, что степень выраженности иммуносупрессивного действия мезенхимальных стволовых клеток на миелин-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов достоверно превышает аналогичный показатель по отношению к митоген-стимулированной пролиферации, что свидетельствует о возможной патогенетической способности мезенхимальных стволовых клеток супрессировать пролиферацию миелин-специфических эффекторных лимфоцитов. Определены механизмы иммунорегуляторного эффекта мезенхимальных стволовых клеток. Показано, что как растворимые факторы, так и клеточно-опосредованное взаимодействие могут быть вовлечены в супрессивную активность мезенхимальных стволовых клеток. При этом растворимые посредники иммунорегуляторных свойств мезенхимальных стволовых клеток — простагландин E_2 и индолеамин 2,3-диоксигеназа — конститутивно ими не продуцируются, а требуют паракринного сигнала от Т-лимфоцитов. Полученные результаты могут быть использованы для индивидуального подхода к оценке иммуномодулирующих свойств мезенхимальных стволовых клеток и дальнейшего применения клеточных культур в патогенетической терапии рассеянного склероза.

Ключевые слова: иммуносупрессия, мезенхимальные стволовые клетки, рассеянный склероз, простагландин E_2 , индолеамин 2,3-диоксигеназа.

Zafranskaya M.M., Nizhegorodova D.B., Yurkevich M.Yu., Bagatka S.S., Ivanchyk H.I., Motuzova Yana M., Fedulov A.S.

MECHANISMS OF ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT PRODUCED BY MESENCHYMAL STEM CELLS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Abstract. We investigated the ability of autologous/allogeneic mesenchymal stem cells (MSC) from early passages, derived from bone marrow of patients with multiple sclerosis, to inhibit mitogen/myelin-induced proliferation of memory T cells. It was shown that MSC immunosuppressive potential of myelin-induced T-cell memory proliferation was significantly higher than an appropriate suppressive effect upon mitogen-stimulated cells. These data provide an evidence for a possible pathogenetic role of MSCs in suppression of myelin-specific proliferation of effector lymphoid cells. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem cells have been determined. It has been shown that both soluble factors and cell-mediated interactions may be involved in immunosuppressive activity of MSCs.

Адрес для переписки:

Зафранская Марина Михайловна
220136, Беларусь, г. Минск, а/я 57.
Тел.: +375 (17) 265-33-56.
Факс: +375 (17) 265-46-43.
E-mail: marina_zafra@yahoo.com

Moreover, soluble mediators of MSC immunoregulatory properties, e.c., prostaglandin E_2 and indoleamine 2,3-dioxygenase, were not produced in constitutive manner, but they require a paracrine signal from T-lymphocytes. The data obtained may be used for development of an individual approach, in order to estimate immunomodulatory properties of MSCs and for further application of cell cultures in pathogenetic therapy of multiple sclerosis. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 237-246)

Keywords: immune suppression, mesenchymal stem cells, multiple sclerosis, prostaglandin E_2 , indoleamine 2,3-dioxygenase.

Введение

Рассеянный склероз (РС) — хроническое прогрессирующее воспалительно-дегенеративное аутоиммунное заболевание центральной нервной системе, представляющее собой одну из наиболее социально и экономически значимых проблем современной нейроиммунологии. Иммунопатогенез РС характеризуется нарушением баланса между регуляторными и потенциально миелин-реактивными клонами Т-лимфоцитов с последующим развитием специфического Т-клеточного иммунного ответа, эффекторные реакции которого направлены на повреждение компонентов миелиновой оболочки аксонов [8, 23]. При рассеянном склерозе Т-лимфоциты рассматриваются как мишень для патогенетического лечения, в основе которого лежит иммуносупрессия или индукция толерантности [9, 30]. Несмотря на существенные в последние десятилетия достижения в лечении РС, связанные с использованием препаратов, модулирующих течение заболевания (интерфероны, глатирамера ацетат, пептидные лиганды, ДНК- и Т-клеточная вакцинация), существующие методы селективной антиген-специфической иммунотерапии РС не всегда являются эффективными [2, 18, 24].

Развитие перспективного направления патогенетической терапии воспалительных демиелинизирующих заболеваний основывается на использовании иммуносупрессивных и нейропротективных свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [13, 27]. МСК могут модулировать иммунный статус, взаимодействуя с иммунной системой на нескольких уровнях: с одной стороны — активируя популяцию регуляторных Т-клеток, а с другой стороны — подавляя пролиферацию Т-лимфоцитов путем усиления ингибиторов клеточного цикла или посредством действия растворимых факторов [3, 22]. Среди множества растворимых факторов, трансформирующий ростовой фактор (TGF)- $\beta 1$ [26], ростовой фактор гепатоцитов (HGF) [4], простагландин E_2 (PGE $_2$) [5] и индолеамин 2,3-диоксигеназа (IDO) [14] рассматриваются как возможные кандидаты, вовлеченные в иммуносупрессивную активность МСК человека.

Изучение иммуномодулирующих эффектов МСК в отношении иммунокомпетентных клеток позволят оценить возможности применения клеточных трансплантатов для разработки принци-

пиально новых подходов в терапии аутоиммунных заболеваний, в частности РС [6, 19].

В данной работе показана способность аутологичных и аллогенных МСК ранних пассажей, выделенных из костного мозга пациентов с РС, ингибировать пролиферацию митоген/миелин-стимулированных Т-клеток памяти и определены возможные механизмы иммунорегуляторного эффекта МСК.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили МСК костного мозга ранних (1-3-го) пассажей и моноклеары периферической крови (МПК), полученные от 25 пациентов (13 мужчин и 12 женщин) с различными формами течения РС, находящихся на стационарном лечении в неврологических отделениях 9-ой ГКБ г. Минска. Средний возраст пациентов на момент забора образцов периферической крови и костного мозга составил 31,88 (от 20 до 52 лет); средняя продолжительность заболевания — 60,6 месяцев (от 2 до 180 месяцев). У 13 пациентов отмечалось рецидивно-ремиттирующее течение РС, у 7 — прогрессивно-ремиттирующее течение РС и у 5 пациентов — вторично-прогрессирующее течение заболевания. Уровень инвалидизации по шкале EDSS на момент забора костного мозга и образцов периферической крови у больных с РС составил 3,76 балла (от 1,5 до 7,5 баллов). Пациенты не получали иммуносупрессивного или иммуномодулирующего лечения в течение 6 месяцев до процедуры забора.

Выделение моноклеаров из периферической венозной крови и пунктата костного мозга человека. Все этапы забора биологического материала (периферической венозной крови и пунктата костного мозга) и выделения моноклеарных клеток выполняли в стерильных условиях после получения информированного согласия пациентов о предоставлении материала для исследований. Моноклеары выделяли путем центрифугирования периферической крови и пунктата костного мозга на градиенте плотности (Histopaque-1077, «Sigma», Германия). Полученные кольца моноклеаров дважды отмывали в фосфатном буфере (PBS, «Gibco», Германия), содержащем 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «Hyclone», Великобритания). Моноклеары костного мозга использовали для получения ранних пассажей МСК.

Культивирование МСК костного мозга человека. Мононуклеары костного мозга ресуспендировали в среде DMEM-LG с 10% ЭТС, 1% антибиотика и 1% L-глутамина («Sigma», Германия), засеивали в чашки Петри с покрытием для адгезивных культур («Greiner», Германия) и культивировали в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С. Через 24 ч и далее каждые 3–4 суток производили смену культуральной среды. По достижению культурами 70–80% конfluence, клетки снимали с поверхности пластика трипсином/ЭДТА («Gibco», Германия). Для микроскопии и мониторинга культур использовали инвертированный микроскоп CarlZeiss Axiovert 200 и высокочувствительную камеру CarlZeiss AxioCam MRm с выдержкой 100 мс («CarlZeiss», Германия).

Оценка пластичности культур МСК костного мозга. Для оценки пластичности и подтверждения полипотентности МСК костного мозга проводили их дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлениях в среде DMEM-LG с пониженным содержанием глюкозы 1000 мг/мл («Sigma», Германия) с добавлением 10% ЭТС и следующих реагентов: дексаметазон 10⁻⁷ М, аскорбиновая кислота 50 мкг/мл, индометацин 50 мкг/мл — для адипогенной дифференцировки; дексаметазон 10⁻⁸, аскорбиновая кислота 50 мкг/мл, 10 мМ β-глицерофосфат («Sigma», Германия) — для остеогенной дифференцировки.

Совместное культивирование МПК с МСК. МПК пациентов с РС, предварительно окрашенные 7 мМ карбоксифлуоресцеином (CFSE, «Sigma», Германия), культивировали в концентрации 2 × 10⁵ клеток/лунку 96-луночного планшета в полной культуральной среде RPMI-1640 с 25 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамина, 1% антибиотика-антимикотика, 10% ЭТС с добавлением 2,5 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА, «Sigma», Германия) или 10 мкг/мл рекомбинантного миелин-олигодендроглиального гликопротеина (рМОГ₁₋₁₂₅, ГУ «РНПЦ Гематологии и трансфузиологии», Беларусь) в присутствии МСК в соотношении МПК:МСК — 10:1 или супернатантов различных клеточных культур (от конfluence культур МСК, от ко-культур МСК и МПК после 5-ти и 10-тидневного культивирования в условиях митоген/антигенной стимуляции) в течение 5 дней (при стимуляции ФГА) и 10 дней (при стимуляции рМОГ₁₋₁₂₅) в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С.

Проточная цитофлуориметрия. Для цитофлуориметрической оценки фенотипа культур МПК использовали моноклональные антитела CD3-PC7, CD4-PE, CD8-PC5, CD45RO-ECD, для культур МСК — CD90-FITC, CD105-PE, CD44-FITC, CD119-PE, CD14-ECD, CD31-FITC, CD34-APC, CD45-PC7 («Beckman Coulter», США; «R&D», Канада). МСК и МПК инкубировали с моноклональными антителами или изоти-

пическими контролями в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Измерения осуществляли на 5-канальном проточном цитофлуориметре FC500 («Beckman Coulter», США).

Для оценки пролиферативного ответа в соответствии с распределением флуоресценции были установлены границы популяции CD3⁺T-клеток среди живых лимфоцитов, в пределах которой выделяли субпопуляции CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RO⁺T-клеток. Пролиферацию T-лимфоцитов и их субпопуляций оценивали как процент не поделившихся (CFSE^{high}) и поделившихся (CFSE^{low}) T-клеток после 5-ти и 10-ти дней культивирования. Результат регистрировали на 50000 событий в пробе.

Иммуноферментный анализ концентрации PGE₂ и IFNγ в супернатантах клеточных культур. Концентрация PGE₂ и γ-интерферона (IFNγ) в супернатантах нестимулированных и митоген/антиген-активированных МПК, культивируемых в присутствии и отсутствии МСК определялась иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов «Parameter™» («R&DSYSTEMS», Канада) и «Вектор-Бест» (Россия), соответственно.

Цитофлуориметрический метод определения IDO. Для внутриклеточного определения IDO МСК совместно культивировали с нестимулированными и митоген-активированными МПК в соотношении 1:10 в лунках 24-х луночного планшета в течение 5 дней. Клеточные культуры МСК и МПК разделяли полупроницаемой мембраной с диаметром пор 0,5 мкм («Nunc», Германия). После окончания культивирования фиксацию клеток осуществляли 4% параформальдегидом в течение 10 минут с последующей пермеабиллизацией 0,5% раствором сапонина. Определение IDO-позитивных МСК проводили с использованием анти-IDO-антител («Abcam», Англия) и вторичных антител, меченных флуорохромом NL557 («R&D», Канада), в концентрациях 10 и 5 мкг/мл, соответственно.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Достоверность различий определяли непараметрическими критериями: Вилкоксона (в случае зависимых переменных) и Манна–Уитни (в случае независимых переменных). Корреляционный анализ выполняли путем определения коэффициентов корреляции по Спирмену. Результаты считали достоверными при уровне значимости p < 0,05; p < 0,01; p < 0,001. Полученные данные представлены как медиана (25-й ÷ 75-й перцентиль).

Результаты

Влияние МСК на митоген/миелин-индуцированную пролиферацию T-лимфоцитов у пациентов с РС.

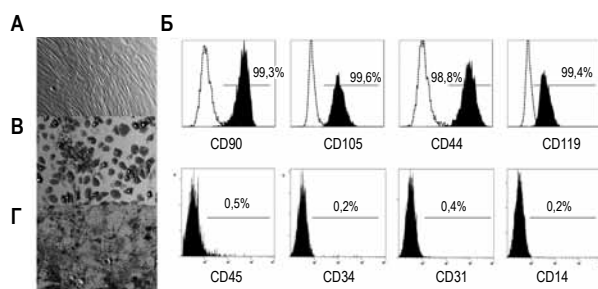


Рисунок 1. Морфологическая и фенотипическая характеристика МСК костного мозга пациентов с РС

Примечание. А – конфлюэнтная культура МСК (ув.100х), Б – фенотип МСК, В – направленная адипогенная дифференцировка МСК (ув.100х), Г – направленная остеогенная дифференцировка МСК (ув.100х).

МСК имеют веретенообразную форму, хорошо прикрепляются к пластику и в процессе роста формируют колонии. Первичные культуры адгезивных клеток костного мозга пациентов с РС характеризовались морфологической гетерогенностью, но, начиная с 1-го пассажа, приобретали фибробластоподобный вид с четко выраженным ядром, ядрышками и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью (рис. 1А) и характерный для МСК фенотип: $CD34^+CD31^+CD45^+CD14^+CD90^+CD105^+CD44^+CD119^+$ (рис. 1Б). Полипотентность культур МСК была подтверждена направленной адипо- и остеогенной дифференцировкой (рис. 1В и Г).

Для определения иммуномодулирующего действия МСК нами была изучена ФГА- и $rMOG_{1-125}$ -индуцированная пролиферация Т-клеточных субпопуляций пациентов с РС в присутствии аутологических и аллогенных МСК ранних пассажей, а также их супернатантов или супернатантов от совместных культур МСК и МПК (ко-культуры). Пролiferация оценивалась методом количественного анализа клеточного деления *in vitro*, основанного на применении внутриклеточного красителя CFSE, флуоресценция которого снижается пропорционально числу клеточных делений. На рисунке 2

представлены оригинальные точечные диаграммы и их проекции в виде гистограмм результатов проточной цитофлуориметрии, отражающие типичное изменение пролиферации $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов пациентов с РС в ответ на поликлональный митоген ФГА в присутствии аутологических МСК 2-го пассажа и различных супернатантов клеточных культур. После 5-дневного культивирования спонтанная пролиферация составила 0,8% – $CFSE^{low}$ поделившиеся лимфоциты (рис. 2А); добавление ФГА значительно стимулировало пролиферацию Т-лимфоцитов, и процент поделившихся клеток составил 63,3% (рис. 2Б), в то время как в присутствии аутологических МСК (рис. 2В) или супернатанта от ко-культуры МСК и МПК (рис. 2Г) количество пролиферирующих $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов в ответ на митоген снижалось до 31,3% и 24,2% $CFSE^{low}$ клеток, соответственно. При культивировании МПК с супернатантами от конфлюэнтных нативных культур МСК ФГА-индуцированная пролиферация $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов не изменялась (рис. 2Д). Аналогичные результаты были получены при оценке влияния МСК на пролиферацию Т-лимфоцитов при культивировании с миелino-вым аутоантигеном $rMOG_{1-125}$.

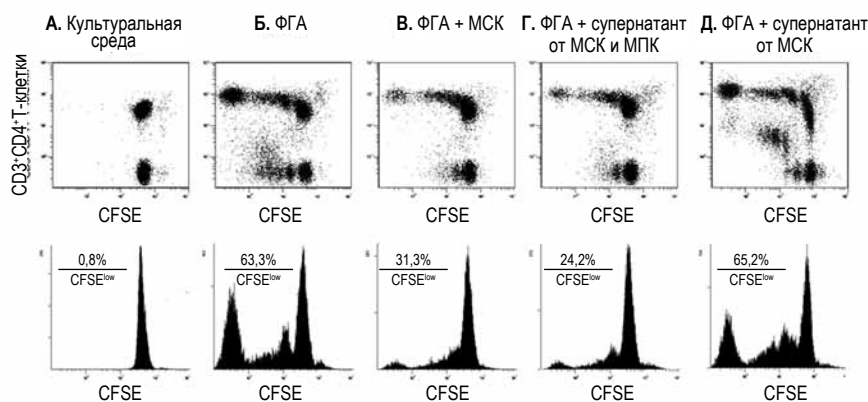


Рисунок 2. ФГА-индуцированная пролиферация $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов в присутствии аутологических МСК 2-го пассажа и различных супернатантов клеточных культур

Примечание. Верхняя панель – точечные диаграммы, нижняя панель – гистограммы проекции точечных диаграмм распределения поделившихся ($CFSE^{low}$) и неподелившихся $CD3^+CD4^+$ Т-клеток.

Принимая во внимание, что ведущая роль в развитии РС отводится миелин-специфическим CD3⁺CD4⁺Th1-лимфоцитам, а также цитотоксическим CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитам с фенотипом Т-клеток памяти (CD45RO⁺) [1, 28], в качестве основного объекта для оценки иммунорегуляторных свойств аутологичных и аллогенных МСК была выбрана популяция Т-клеток памяти. Статистическая обработка результатов пролиферации Т-клеток памяти и их субпопуляций, культивируемых в присутствии и отсутствии МСК в условиях митогенной/антигенной стимуляции у пациентов с РС представлена в таблице 1.

Добавление МСК в культуру как ФГА-, так и миелин-стимулированных МПК приводило к достоверному снижению пролиферации популяций Т-лимфоцитов. Следует отметить, что наиболее выражено супрессия антиген-неспецифической пролиферации отмечалась по отношению к CD3⁺CD45RO⁺ и CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитам при наличии тенденции в супрессии пролиферации CD8⁺CD45RO⁺Т-клеток, в то время, как МСК пациентов с РС достоверно снижали миелин-специфическую пролиферацию как CD4⁺, так и CD8⁺Т-клеток памяти.

Для характеристики степени выраженности ингибирующего влияния МСК на пролиферацию Т-лимфоцитов была выведена формула расчета коэффициента супрессии пролиферативного ответа k (%):

$$k = 100 - \frac{P_{\text{Тп+МСК}} \times 100}{P_{\text{Тп}}},$$

где $P_{\text{Тп + МСК}}$ — количество поделившихся Т-лимфоцитов в ко-культуре МПК и МСК/супернатантов, стимулированной митогеном/аутоантигеном, %;

$P_{\text{Тп}}$ — количество поделившихся Т-лимфоцитов в культуре МПК, стимулированной митогеном/аутоантигеном, %.

На рисунке 3А представлены коэффициенты супрессии k митоген/миелин-индуцированной пролиферации Т-клеток памяти пациентов с РС

при совместном культивировании с аутологичными и аллогенными МСК. Нами не было выявлено достоверных различий в супрессивной способности аутологичных и аллогенных МСК как при стимуляции Т-лимфоцитов ФГА, так и рМОГ₁₋₁₂₅, в связи с чем для дальнейшего статистического анализа показатели, характеризующие иммуносупрессивные свойства аутологичных и аллогенных МСК на пролиферацию Т-клеток памяти пациентов с РС, были объединены. На рисунке 3Б представлены медианы коэффициентов супрессии МСК пролиферации митоген- и миелин-стимулированных CD3⁺45RO⁺ лимфоцитов. Установлено, что коэффициент супрессии k антиген-специфической пролиферации Т-клеток памяти пациентов с РС был достоверно выше по сравнению с аналогичным показателем по отношению к антиген-неспецифическому клеточному делению. Кроме того, коэффициент супрессии МСК k миелин-специфической пролиферации обратно пропорционально коррелировал с EDSS пациентов с РС: с увеличением тяжести заболевания коэффициент супрессии k миелин-специфической пролиферации Т-клеток памяти достоверно снижался ($R = -0,5$; $p < 0,05$).

Влияние МСК-опосредованной продукции PGE₂ на пролиферацию МПК в условиях антигенной стимуляции.

Для определения механизмов реализации антипролиферативного потенциала МСК у пациентов с РС нами была изучена продукция PGE₂ в различных клеточных культурах и оценено влияние концентрации PGE₂ на антиген-неспецифические и антиген-специфические реакции Т-лимфоцитов.

В нестимулированных культурах МПК отмечалась продукция PGE₂ с тенденцией к уменьшению при увеличении времени культивирования. Так, концентрация PGE₂ в культуре МПК после 5-дневного культивирования составила 1067 (355,3 ÷ 1500) пг/мл, а после 10-тидневного — 553,5 (200,3 ÷ 1 083) пг/мл ($p = 0,04$).

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО ПОДЕЛИВШИХСЯ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ (%), КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ПРИСУТСТВИИ И ОТСУТСТВИИ МСК, В ОТВЕТ НА МИТОГЕН И МИЕЛИНОВЫЙ АНТИГЕН У ПАЦИЕНТОВ С РС (n = 25)

Условия культивирования	Индукторы клеточной пролиферации					
	ФГА			рМОГ ₁₋₁₂₅		
	CD3 ⁺ 45RO ⁺	CD4 ⁺ 45RO ⁺	CD8 ⁺ 45RO ⁺	CD3 ⁺ 45RO ⁺	CD4 ⁺ 45RO ⁺	CD8 ⁺ 45RO ⁺
Культуральная среда	6,4 (3,5 ÷ 10,0)	7,9 (3,2 ÷ 14,2)	24,2 (17,9 ÷ 38,4)	16,7 (14,5 ÷ 23,5)	19,9 (13,0 ÷ 26,5)	25,0 (11,3 ÷ 46,8)
Индуктор клеточной пролиферации	66,1 (52,1 ÷ 83,7)	66,5 (54,3 ÷ 80,8)	83,6 (70,0 ÷ 90,7)	31,8 (15,0 ÷ 35,9)	32,2 (13,0 ÷ 36,4)	57,7 (30,0 ÷ 75,2)
Индуктор клеточной пролиферации + МСК	42,3** (29,0 ÷ 51,8)	44,7** (25,2 ÷ 61,2)	70,4 $p = 0,06$ (58,8 ÷ 78,9)	15,6** (9,1 ÷ 24,4)	17,2** (8,8 ÷ 26,6)	37,6** (13,6 ÷ 50,9)

Примечание. ** — $p < 0,01$, достоверность указана по отношению к митоген/антиген-индуцируемой пролиферации Т-клеток памяти.

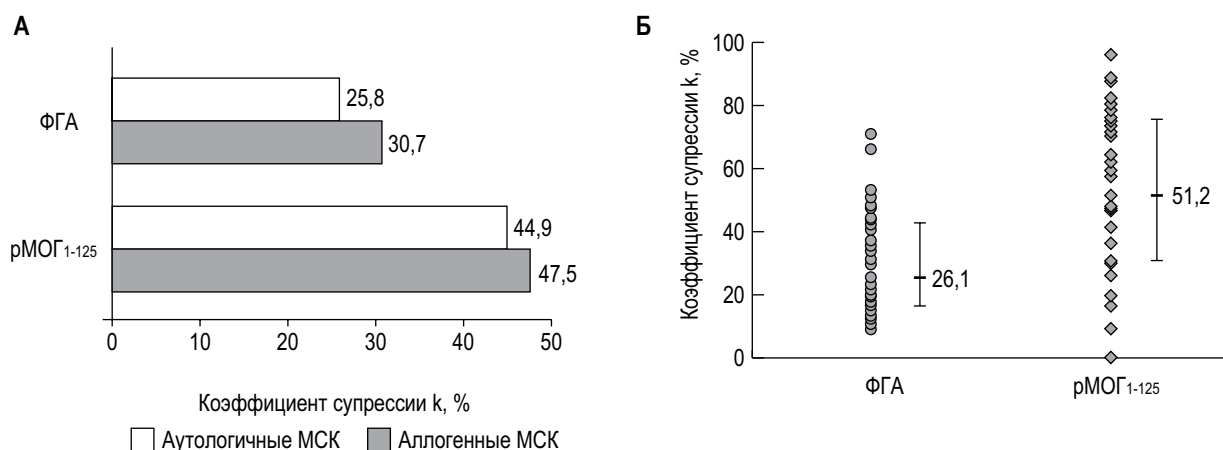


Рисунок 3. Коэффициенты супрессии k (%) пролиферации $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов пациентов с РС в присутствии аутологичных и аллогенных культур МСК (А) и медианы k МСК, культивируемых с МПК в условиях ФГА/рМОГ₁₋₁₂₅-индуцированной стимуляции (Б), ($n = 25$)

По сравнению со спонтанной продукцией не было выявлено достоверных различий в синтезе PGE_2 МПК, культивируемых в присутствии ФГА и рМОГ₁₋₁₂₅. Добавление к МПК как аутологичных, так и аллогенных МСК приводило к достоверному увеличению продукции PGE_2 не зависимо от условий культивирования ($p < 0,01$), чего не наблюдалось при культивировании клеток с супернатантами от нативных культур МСК (рис. 4). При этом установлена выраженная обратная корреляция между концентрацией PGE_2 в ко-культурах МПК и МСК при культивировании с рМОГ₁₋₁₂₅ и количеством поделившихся $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов в ответ на антиген ($R = -0,8$; $p < 0,01$).

На рисунке 5 представлены обобщенные результаты зависимости продукции PGE_2 в клеточных культурах и супрессии митоген-индуцированной пролиферации $CD3^+CD4^+$ Т-

лимфоцитов. Наиболее выраженные коэффициенты супрессии $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов наблюдались при культивировании МПК в присутствии или МСК, или супернатантов клеточных культур, полученных при совместном культивировании МПК и МСК с соответствующей высокой концентрацией PGE_2 в супернатантах. В то же время добавление к МПК супернатантов от МСК с низкой пороговой концентрацией PGE_2 не приводило к супрессии митоген-индуцированной пролиферации Т-клеточных субпопуляций. Аналогичная тенденция прослеживается и при анализе зависимости продукции PGE_2 и миелин-специфической пролиферации Т-лимфоцитов.

Внутриклеточное определение IDO в МСК при совместном культивировании с ФГА-стимулированными МПК.

Основываясь на том, что одним из известных механизмов иммуносупрессии является акти-

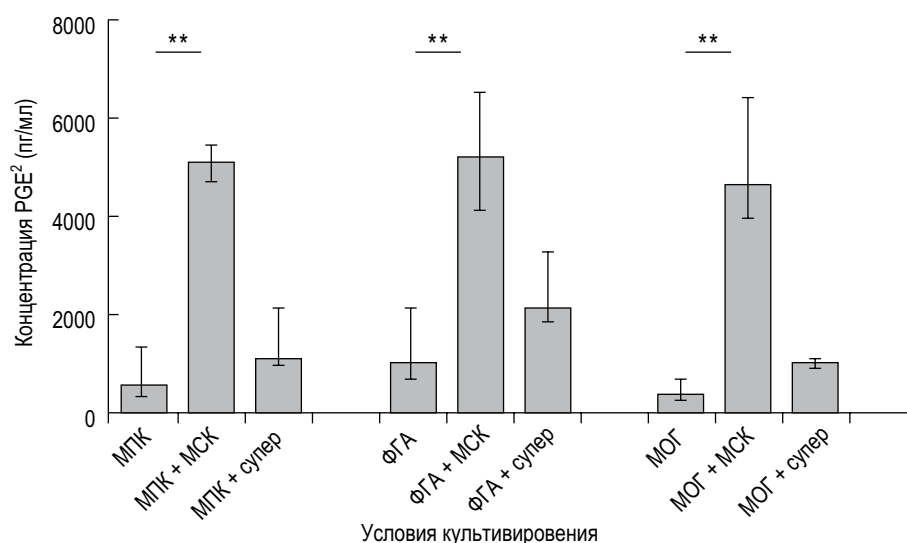


Рисунок 4. Продукция PGE_2 при культивировании МПК с МСК или супернатантами от нативных культур МСК (супер-) в условиях митогенной (ФГА) и антигенной (рМОГ₁₋₁₂₅) стимуляции ($n = 17$)

Примечание. ** – достоверные различия ($p < 0,01$) по отношению к продукции PGE_2 в нестимулированной культуре МПК.

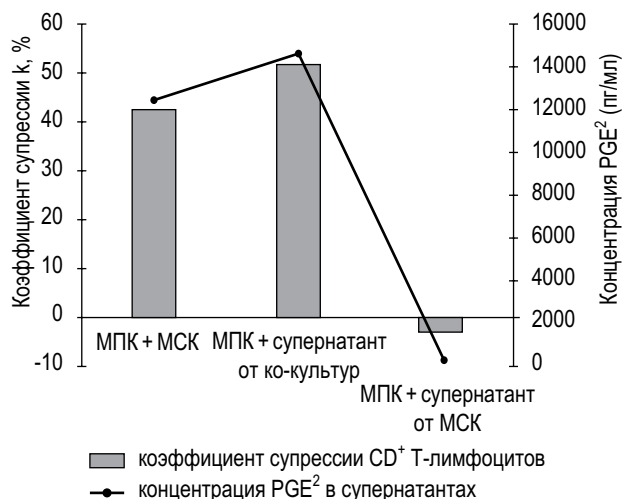


Рисунок 5. Зависимость коэффициента супрессии пролиферации МПК в условиях митогенной (2,5 мкг/мл ФГА) стимуляции от концентрации PGE₂ (n = 17)

вация фермента IDO, осуществляющего супрессию клеточных реакций за счет конверсии триптофана в кинуренин [10, 15, 16], нами была проведена оценка экспрессии IDO в МСК при различных условиях культивирования в присутствии нестимулированных и митоген-активированных МПК.

При совместном культивировании нестимулированных МПК с МСК наблюдалась незначительная экспрессия IDO последними, тогда как культивирование МСК с ФГА-активированными МПК в течение 5 дней приводило к значительному возрастанию экспрессии IDO (рис. 6А) наряду с выраженной супрессией митоген-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов ($R = 0,63$; $p < 0,05$).

Для доказательства паракринного влияния провоспалительных факторов со стороны Т-лимфоцитов на экспрессию IDO в МСК было проведено совместное культивирование с использованием мембраны, разделяющей популяции МСК и нестимулированных или ФГА-активированных МПК. Показано, что МСК экспрессируют IDO на высоком уровне при кокультивировании с ФГА-активированными МПК в отсутствии межклеточного контакта (рис. 6Б).

Параллельно в супернатантах исследуемых ко-культур была определена концентрация IFN γ как одного из растворимого фактора, продуцируемого митоген-активированными Т-лимфоцитами и регулирующего функциональную активность IDO в МСК [21, 22] и экспрессия рецептора к IFN γ (CD119) на МСК. Установлено, что ФГА-активированные МПК продуцируют IFN γ в высокой концентрации (1785,2 (455,0 ÷ 1816,0) пг/мл), тогда как уровень его спонтанной секреции составил 44,5 (36,6 ÷ 100,0) пг/мл. При добавлении МСК к активированным МПК концентрация IFN γ в супернатантах достоверно снижалась до 140,6 (119,7 ÷ 1266) пг/мл ($p < 0,05$), что достоверно кор-

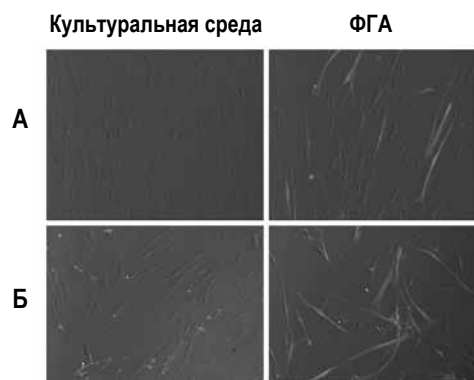


Рисунок 6. Определение IDO в МСК, ко-культивируемых с нестимулированными и ФГА-активированными МПК в отсутствии (А) и в присутствии (Б) разделяющей культуры полупроницаемой мембраны (ув.100х, иммунофлуоресценция)

релировало с уровнем экспрессии IDO в МСК ($R = -0,6$; $p < 0,05$). Данные результаты свидетельствуют о возможном связывании IFN γ со своим рецептором CD119, который определялся на МСК исследуемых ко-культур в 99,3% (98,5 ÷ 99,4%), индуцируя внутриклеточную активацию экспрессии IDO.

Обсуждение

В последние годы стало очевидным, что наряду с регенеративным потенциалом МСК способны проявлять выраженные иммуномодулирующие эффекты в отношении иммунокомпетентных клеток, что является перспективным направлением для разработки подходов к управлению патогенезом аутоиммунных заболеваний. Показано, что МСК *in vitro* могут оказывать дозозависимое антипролиферативное воздействие на лимфоциты в результате как непосредственного взаимодействия клеток, так и действия различных растворимых факторов [4, 5, 26]. Накопленная информация свидетельствует о том, что в основе терапевтического эффекта при введении МСК в случае РС или его экспериментальной модели — экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) — лежат следующие механизмы: нейропротективное действие, обусловленное взаимодействием трансплантированных МСК с клетками реципиента либо секрецией ростовых факторов [29]; иммуномодулирующее воздействие, наблюдаемое и при системном и при локальном введении [30]; ремиелинизация поврежденных участков ЦНС за счет функциональной активности трансплантированных клеток [11]. В экспериментах *in vitro* продемонстрирована способность МСК ингибировать Т-клеточную пролиферацию и активацию в ответ на митогенные и антигенные стимулы дозо-зависимым об-

разом. Механизм МСК-опосредованного ингибирования Т-клеточной пролиферации и анергия Т-лимфоцитов заключается в остановке клеточного деления на G0-G1 фазе клеточного цикла вследствие снижения циклина D₂ и повышения p27 [7]. Кроме того, МСК могут супрессировать пролиферацию В-лимфоцитов, NK-клеток и дендритных клеток [17, 22].

В основе патогенеза РС лежат иммунологические процессы, связанные с нарушением регуляторной функции иммунной системы и активацией миелин-специфических клонов как CD4⁺, так и CD8⁺Т-клеток памяти (CD45RO⁺) [1, 9, 23]. Нами продемонстрирована способность аутологических и аллогенных культур МСК ранних пассажей костного мозга пациентов с РС в равной степени ингибировать *in vitro* антиген-неспецифическую и миелин-индуцированную пролиферацию Т-клеток памяти. Для оценки влияния МСК на миелин-специфическую пролиферацию Т-клеток памяти пациентов с РС был использован один из основных иммунодоминантных миелиновых белков — рМОГ₁₋₁₂₅, который, в отличие от других миелиновых антигенов, обнаруживается не только в компактных миелиновых волокнах оболочки аксонов, но и локализуется на внешней поверхности мембраны олигодендроцитов, в связи с чем представляет собой наиболее вероятную мишень для аутореактивных Т-лимфоцитов [12].

Некоторые авторы предполагают, что иммуносупрессивная активность МСК не является антиген-специфической, т.е. МНС-рестриктированной, и демонстрируют МСК-опосредованное ингибирование пролиферации наивных Т-клеток и Т-клеток памяти как в ответ на специфическую, так и митоген-индуцированную стимуляцию Т-лимфоцитов [20]. В нашей работе продемонстрировано, что степень выраженности иммуносупрессивного действия МСК на миелин-индуцированную пролиферацию Т-клеток памяти достоверно превышала аналогичный показатель по отношению к митоген-стимулированной пролиферации (рис. 3Б), что свидетельствует о возможной патогенетической способности МСК супрессировать пролиферацию миелин-специфических эффекторных клеток при РС. Выявленная супрессия обратно коррелировала с EDSS пациентов с РС. В этом случае низкий уровень миелин-специфической супрессии МСК у пациентов с высокими значениями EDSS, возможно, связан с развитием и доминированием в данной группе нейродегенеративных процессов над аутоиммунными реакциями, что необходимо учитывать при планировании патогенетической терапии с использованием МСК.

В настоящий момент активно дискутируется вопрос о роли растворимых факторов и меж-

клеточных контактов в проявлении иммунологических свойств МСК. Большинство исследователей фокусирует внимание на роли непосредственного контакта клеток в модулировании иммунного ответа, указывая на то, что растворимые факторы опосредуют иммуномодулирующие эффекты лишь частично [7, 17]. С другой стороны, в экспериментах по культивированию МСК и Т-лимфоцитов, разделенных полупроницаемой мембраной, обнаружено сохранение иммуносупрессивного потенциала МСК [16, 21].

Для определения механизмов реализации антипролиферативного потенциала мезенхимальными стволовыми клетками нами была изучена продукция PGE₂ в различных клеточных культурах и оценено влияние концентрации PGE₂ на антиген-неспецифические и антиген-специфические реакции Т-лимфоцитов больных РС. Показано, что добавление супернатантов от нативных культур МСК не приводит к изменению пролиферации митоген/миелин-активированных лимфоцитов, что может свидетельствовать об отсутствии конститутивной продукции МСК растворимых факторов, обладающих иммунорегуляторными свойствами. Антигенная стимуляция не влияла на продукцию PGE₂ культурами МПК и только добавление аутологических/аллогенных МСК, приводило к достоверному увеличению продукции PGE₂ параллельно с выраженной иммуносупрессией в отношении как митоген-, так и миелин-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов. В то же время добавление к активированным лимфоцитам супернатантов с высоким уровнем PGE₂, полученных от совместных культур МСК и МПК, также резко угнетало как антиген-неспецифическую, так и антиген-специфическую пролиферацию Т-лимфоцитов. Полученные результаты подтверждаются выраженной обратной корреляцией ($R = -0,8$; $p < 0,01$) между концентрацией PGE₂ в ко-культуре МПК при культивировании с рМОГ₁₋₁₂₅ и МСК и количеством поделившихся CD3⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитов.

Tilley S. с соавт. (2001) показали, что PGE₂, увеличивая внутриклеточное содержание цАМФ, определяет ингибицию пролиферации лимфоцитов, снижает экспрессию рецепторов к трансферрину, угнетает секрецию лимфокинов (IL-1, IL-2 и др.) и способствует снижению экспрессии МНС II на антиген-презентирующих клетках, нарушая презентацию антигенов. В таких условиях образуются лимфоциты, секретирующие неспецифические супрессивные факторы, угнетающие иммунные реакции и потенцирующие толерогенный процессинг антигена макрофагами [25].

Полученные нами результаты согласуются с K. English et al., которые объясняют механизмы МСК-медиированной аллосупрессии экспрессией продукцией PGE₂ в результате прямого кон-

такта МСК с CD4⁺Т-лимфоцитами и последующей индукцией регуляторных Т-клеток [5].

Одним из известных механизмов иммуносупрессии является активация фермента IDO, катализирующего конверсию триптофана в кинуренин. Активация IDO за счет синтеза иммуносупрессивных метаболитов триптофана приводит к супрессии Т-клеточных реакций, подавляя пролиферацию Т-лимфоцитов или вызывая их апоптоз. Согласно литературным данным, функциональная активность IDO не является постоянной [10, 15, 16]. Нами не было выявлено в культурах МСК ранних пассажей пациентов с РС конститутивной экспрессии IDO, что свидетельствует об отсутствии в нативных МСК IDO-опосредованных механизмов иммуносупрессии.

Результаты экспериментов по культивированию МСК и митоген-активированных МПК, разделенных полупроницаемой мембраной, доказывают участие IDO в опосредовании иммуносупрессивных свойств МСК, так как супрессия пролиферативного ответа Т-лимфоцитов наблюдалась только при их культивировании с МСК, экспрессирующими IDO на высоком уровне. При этом установлено, что IDO определяется в МСК при культивировании последних с митоген-активированными МПК, не зависимо от наличия или отсутствия клеточных контактов. Таким образом, стимуляция экспрессии IDO в МСК происходит при развитии активного воспалительного процесса, сопровождающегося активацией Т-лимфоцитов и синтезом ими провоспалительных факторов [14, 16].

Основным цитокином, определяющим активность IDO, является IFN γ , уровень антивирусной и антибактериальной активности которого коррелирует со степенью индукции данного фермента. На сегодняшний день известно, что воздействие IFN γ , опосредованное через его рецептор CD119, является необходимым условием для проявления иммунорегуляторных свойств МСК в полной мере [21, 22].

Высокий уровень продукции IFN γ митоген-активированными МПК, установленное нами его снижение в присутствии МСК, экспрессирующих IDO, и позитивный фенотип МСК по CD119, подтверждают роль IFN γ в механизмах супрессии МСК посредством индукции экспрессии IDO в МСК костного мозга.

Заключение

Полученные результаты позволяют констатировать, что аутологичные и аллогенные МСК ранних пассажей пациентов с РС в равной степени ингибируют антиген-неспецифическую и миелин-индуцированную пролиферацию патогенетически значимых Т-клеток памяти. При этом степень выраженности иммуносупрессивного действия МСК на миелин-индуцированную

пролиферацию Т-лимфоцитов достоверно превышает аналогичный показатель по отношению к митоген-стимулированной пролиферации. Выраженный ингибирующий эффект МСК в отношении данной популяции клеток свидетельствует о возможной патогенетической способности МСК супрессировать пролиферацию миелин-специфических эффекторных Т-лимфоцитов.

Иммуномодулирующие эффекты МСК могут проявлять как в результате межклеточного контакта с Т-лимфоцитами, так и посредством гуморальных факторов. Доказано участие простагландина E₂ и индолеамин 2,3-диоксигеназы в опосредовании иммуносупрессивных свойств МСК. При этом растворимые посредники иммунорегуляторных свойств МСК конститутивно ими не продуцируются, а требуют паракринного сигнала от Т-лимфоцитов. Полученные результаты могут быть использованы для индивидуального подхода к оценке иммуномодулирующего потенциала МСК и дальнейшего использования клеточных культур в патогенетической терапии РС.

Список литературы

1. Зафранская М.М., Федулов А.С., Нижегородова Д.Б., Мотузова Я.М., Юркевич М.Ю., Багатка С.С., Миланович Н.Ф. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на пролиферацию Т-клеток памяти у пациентов с рассеянным склерозом // Вести Нац. Акад. Наук Беларуси. — 2010. — № 3. — С. 24-31.
2. Нижегородова Д.Б., Эберль М., Зафранская М.М. Современные аспекты иммунопатогенеза рассеянного склероза // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2005. — № 2. — С. 44-55.
3. Bai L., Lennon D., Eaton V., Maier K., Caplan A., Miller S., Miller R. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis // *Glia*. — 2009. — Vol. 57, N 11. — P. 1192-1203.
4. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Lonqoni P., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A. Human bone marrow cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli // *Blood*. — 2002. — Vol. 99. — P. 3838-3843.
5. English R., Ryan J., Tobin L., Murphy M., Barry F., Mahon B. Cell contact, PGE2 and TGF beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ regulatory T cells // *Clinical and Experimental Immunology*. — 2009. — Vol.156. — P. 149-160.
6. Gerdoni E., Gallo B., Casazza S., Musio S., Bonanni I., Pedemonte E., Mantegazza R., Frassoni F., Mancardi G., Pedotti R., Uccelli A. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental

- autoimmune encephalomyelitis // *Ann. Neurol.* – 2007. – Vol. 61, N 3. – P. 219-227.
7. Glenie S., Soeiro I., Dyson P., Lam E., Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105:2821-2827.
8. Hafler D. Multiple sclerosis // *The journal of clinical investigation.* – 2004. – Vol. 113, N 6. – P. 788-794.
9. Holmoy T. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: concepts and controversies // *Acta Neurol. Scand.* – 2007. – N 115. – P. 39-45.
10. Hwu P., Du M., Lapointe R., Do M., Taylor M., Young H. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T-cell proliferation // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164, N 7. – P. 3596-3599.
11. Karussis D., Kassis I., Kurkalli B., Slavin S. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases // *J. Neurol. Sci.* – 2008. – Vol. 265, N 1-2. – P. 131-135.
12. Koehler N., Genain C., Giesser B., Hauser S. The human T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein: a multiple sclerosis family-based study // *J. Immunol.* – 2002. – № 168. – P. 5920-5927.
13. Krampera M., Franchini M., Pizzolo G., Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use // *Blood Transfus.* – 2007. – Vol. 5. – P. 120-129.
14. Meisel R., Zibert A., Laryea M., Gobel U., Daubener W., Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation // *Blood.* – 2004. – Vol. 103, N 12. – P. 4619-4621.
15. Mellor A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 338. – P. 20-24.
16. Muller A., Prendergast G.C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer // *Current Cancer Drug Targets.* – 2007. – Vol. 7. – P. 31-40.
17. Nauta A., Fibbe W. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells // *Blood.* – 2007. – Vol. 110. – P. 3499-3506.
18. Pender M., Wolfe N. Prevention of autoimmune attack and disease progression in multiple sclerosis: current therapies and future prospects // *Intern. Med. J.* – 2002. – Vol. 32, N 11. – P. 554-563.
19. Prevosto C., Zancolli M., Canevali P., Zocchi M., Poggi A. Generation of CD4+/CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction // *Haematologica.* – 2007. – Vol. 92. – P. 321-326.
20. Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blank K. Mesenchymal stem cell inhibit lymphocytes proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms // *Exp. Cell. Res.* – 2005. – Vol. 305. – P. 33-41.
21. Ryan J., Barry F., Murphy J., Mahon B. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells // *Clin. Exp. Immunol.* – 2007. – Vol. 149. – P. 353-363.
22. Shi Y., Hu G., Su J., Li W., Chen Q., Shou P., Xu C., Chen X., Huang Y., Zhu Z., Huang X., Han X., Xie N., Ren G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair // *Cell Research.* – 2010. – Vol. 20. – P. 510-518.
23. Sospedra M., Martin R. Immunology of multiple sclerosis // *Annual review immunology.* – 2005. – N 23. – P. 683-747.
24. Steinman L. Immunotherapy of multiple sclerosis: the end of the beginning // *Curr. Opin. Immunol.* – 2001. – Vol. 13, N 5. – P. 597-600.
25. Tilley S., Coffman T., Koller B. Mixed message: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxane // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108. – P. 15-19.
26. Tyndall A., Uccelli A. Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks // *Bone Marrow Transplant.* – 2009. – Vol. 43, N 11. – P. 821-828.
27. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8, N 9. – P. 726-736.
28. Zafranskaya M., Oschmann P., Engel R., Weishaupt A., van Noort J., Jomaa H., Eberl M. Interferon- β therapy reduce CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis // *Immunology.* – 2007. – Vol. 121, N 1. – P. 29-39.
29. 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. – Vol. 106, N 5. – P. 1755-1761.
30. Zhang J., Li Y., Chen J., Cui Y., Lu M., Elias S., Mitchell J. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice // *Exp. Neurol.* – 2005. – Vol. 195. – P. 16-26.

поступила в редакцию 04.02.2011
отправлена на доработку 13.02.2011
принята к печати 17.02.2011