

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ МСК НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ Т-КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЛИМФОПЕНИИ ПОСЛЕ ВЫСОКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

Баторов Е.В.¹, Шевела Е.Я.¹, Тихонова М.А.¹, Пронкина Н.В.¹,
Баторова Д.С.¹, Крючкова И.В.¹, Поспелова Т.И.², Останин А.А.¹,
Черных Е.Р.¹

¹ ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

² ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Целью работы явилась оценка влияния мезенхимальных стромальных клеток (МСК) больных лимфомами на гомеостатическую пролиферацию лимфоцитов *in vitro* и *in vivo*. Полученные данные впервые продемонстрировали, что МСК больных лимфомами в широком диапазоне соотношений МСК:МНК (от 1:50 до 1:2) способны усиливать *in vitro* пролиферацию МНК доноров и больных лимфомами в ответ на IL-2 или IL-7. При этом важным фактором, детерминирующим стимулирующий эффект МСК, является реактивность отвечающих лимфоцитов на IL-2 или IL-7. Исследования *ex vivo* показали, что, в отличие от стандартной АТГСК, у пациентов с ко-трансплантацией МСК CD8⁺Т-клетки, особенно клетки памяти, на этапе выхода из лейкопении содержат большую долю пролиферирующих клеток, чем до АТГСК. Кроме того, в этой группе не наблюдалось возрастания апоптоза наивных CD4⁺Т-клеток, что было характерно при проведении стандартной АТГСК. Полученные данные означают, что стимулирующий эффект МСК на пролиферацию Т-клеток в условиях индуцированной лимфопении реализуется преимущественно в отношении CD8⁺Т-клеток памяти, тогда как более эффективное восстановление наивных CD4⁺Т-клеток обусловлено анти-апоптотическим эффектом МСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, IL-2, IL-7, Т-лимфоциты, пролиферация

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна
д.м.н., профессор,
член-корр. РАМН,
заведующая лабораторией
клеточной иммунологии
ФГБУ «НИИ клинической
иммунологии» СО РАМН
630099, Россия,
г. Новосибирск,
ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Авторы:

Баторов Е.В. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Шевела Е.Я. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Пронкина Н.В. — к.б.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Баторова Д.С. — врач-гематолог гематологического отделения с блоком трансплантации костного мозга ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Крючкова И.В. — к.м.н., заведующая гематологическим отделением с блоком трансплантации костного мозга ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Поспелова Т.И. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой терапии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАМН, заведующая лабораторией клеточной иммунологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Поступила 05.12.2013

Принята к печати 23.12.2013

POSSIBLE MECHANISMS OF STIMULATORY EFFECTS OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS UPON T CELL RECOVERY DURING CHEMOTHERAPY-INDUCED LYMPHOPENIA

Batorov E.V.^a, Shevela E.Ya.^a, Tikhonova M.A.^a, Pronkina N.V.^a,
Batorova D.S.^a, Kryuchkova I.V.^a, Pospelova T.I.^b, Ostanin A.A.^a,
Chernykh E.R.^a

^a Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of present work was to evaluate the effect of mesenchymal stromal cells (MSCs) from lymphoma patients on the *in vitro* and *in vivo* homeostatic proliferation of lymphocytes. Our data have demonstrated for the first time, that MSCs from lymphoma patient are able to enhance the *in vitro* proliferation of donor and patient mononuclear cells (MNCs) in response to IL-2 or IL-7. This effect was observed within a wide range of MSC-to-MNC ratios (1:50-1:2). Lymphocyte reactivity to IL-2 or IL-7 was found to be an important factor determining the stimulatory effect of MSCs. *Ex vivo* studies in the patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) have shown that the patients co-transplanted with MSCs exhibited higher proportions of proliferating CD8⁺T cells (especially, memory cells) at the day of engraftment, than before AHSCT, as compared to the patients subjected to standard AHSCT protocols. Moreover, there was no an increase in apoptosis of naive CD4⁺T cells that was typical for standard AHSCT. These data indicate that the stimulatory effect of MSCs upon T lymphocyte proliferation following chemotherapy-induced lymphopenia concerns, mainly, the memory CD8⁺T cell population, whereas more efficient recovery of naive CD4⁺T cells is due to anti-apoptotic effects of MSCs. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 2, pp 139-148)

Keywords: mesenchymal stromal cells, IL-2, IL-7, T-lymphocytes, proliferation

Address for correspondence:

Chernykh Elena R.
PhD, MD, Professor,
Corresponding Member, Russian
Academy of Medical Sciences,
Head, Laboratory of Cellular
Immunotherapy, Research
Institute of Clinical Immunology,
Russian Academy of Medical
Sciences, Siberian Branch
630099, Russian Federation,
Novosibirsk, Yadrintsevskaya str.,
14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Authors:

Batorov E.V., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Pronkina N.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunology, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Batorova D.S., Clinical Hematologist, Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Kryuchkova I.V., PhD (Medicine), Head, Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Pospelova T.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Therapy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation
Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation
Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Medical Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

Received 05.12.2013

Accepted 23.12.2013

Введение

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) относятся к классу соматических стволовых клеток, которые наряду с дифференцировочным потенциалом обладают выраженной иммунорегуляторной активностью [9]. Так, способность МСК к иммуносупрессии активно обсуждается для обоснования возможности использования МСК в лечении аутоиммунных заболеваний и трансплантационных реакций [5, 7]. Кроме того, МСК проявляют гемопоэзстимулирующую активность, участвуя в создании гемопоэтического микроокружения и продуцируя факторы роста и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [4, 16, 17]. Эти свойства позволяют использовать МСК с целью улучшения приживления гемопоэтических предшественников и ускорения восстановления кроветворения при проведении трансплантации ГСК [4, 14, 17].

Действительно, проведенные нами ранее исследования показали, что ко-трансплантация МСК при проведении аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) у больных лимфомами сопровождается значимым сокращением периода критической нейтро- и тромбоцитопении [22]. При этом нами было обнаружено, что пациенты с ко-трансплантацией МСК характеризуются более ранним восстановлением лимфоцитов и отличаются более эффективной реконституцией Т-клеток [1, 2].

Известно, что восстановление Т-лимфоцитов в условиях лимфопении, индуцированной высокодозной химиотерапией, осуществляется посредством двух механизмов — тимопоэза и экспансии зрелых Т-клеток за счет гомеостатической пролиферации [20], причем включение тимопоэза происходит достаточно поздно (не ранее 6-12 мес. после трансплантации), и доминирующим механизмом восстановления Т-клеток в раннем восстановительном периоде является гомеостатическая пролиферация [8]. Исходя из этого, мы предположили, что выявленный нами ранее стимулирующий эффект МСК на реконституцию Т-клеток может быть обусловлен способностью МСК усиливать гомеостатическую пролиферацию. Действительно, рядом авторов было показано, что при использовании низких доз МСК и при низком уровне базальной пролиферации отвечающих клеток мезенхимальные клетки усиливают пролиферацию лимфоцитов [18, 19, 21]. Стимулирующий эффект МСК на реконституцию Т-клеток у пациентов с ко-трансплантацией МСК мог быть также отчасти обусловлен сниженной супрессорной активностью МСК у больных лимфомами [3, 23].

В настоящем исследовании была предпринята попытка оценить влияние МСК больных лимфомами на гомеостатическую пролиферацию лимфоцитов *in vitro* и *in vivo*. Для решения первой задачи предполагалось исследовать эффект МСК на пролиферативный ответ лимфоцитов, стимулированных «гомеостатическими цитокинами» — IL-2 и IL-7 в культуре *in vitro*. Для решения второй задачи планировалось оценить *ex vivo* параметры клеточного цикла различных субпопуляций Т-лимфоцитов в группах пациентов со стандартной ауто-ТГСК и ко-трансплантацией МСК.

Материалы и методы

Получение МСК

Для генерации МСК использовали клетки лейкоцвеси, полученные в результате гравитационного разделения, которые культивировали (10^6 клеток/см²) в среде α -MEM/10% FCS в пластиковых флаконах («Nunclon», Дания) при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Через 72 ч неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а фракцию адгезивных клеток культивировали до получения клеточного монослоя. Обновление питательной среды проводили дважды в неделю. Отделение МСК при пассировании осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина (Sigma-Aldrich, США) и 0,02% раствора ЭДТА (ICN, США). В случае генерации МСК, предназначенных для ко-трансплантации пациентам с ауто-ТГСК, в качестве аналога FCS использовали 3-5% лизата тромбоцитов, который получали по стандартной методике [12].

Оценка влияния МСК на пролиферативную активность лимфоцитов

Для оценки регуляторной активности МСК использовали мезенхимальные клетки, полученные из костного мозга 22 пациентов со злокачественными лимфомами, включая 11 мужчин и 11 женщин в возрасте от 20 до 57 лет (медиана 35 лет). Все пациенты находились на стационарном лечении в отделении гематологии и трансплантации костного мозга Клиники иммунопатологии ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН. В 7 случаях у пациентов диагностировалась неходжкинская лимфома (НХЛ), в 13 — лимфома Ходжкина (ЛХ) и в 2-х — множественная миелома (ММ). Тестирование МСК проводили в культурах мононуклеарных клеток (МНК) больных и здоровых доноров. Группу условно здоровых доноров составили 14 волонтеров, совместимых по полу и возрасту. Забор крови и костного мозга проводили после получения письменного информированного согласия.

МНК выделяли из венозной крови стандартно путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho = 1,078$).

МНК (10^5 клеток/лунку) культивировали в среде RPMI-1640 с 10% инактивированной сыворотки доноров АВ (IV) группы в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии/отсутствии различных доз МСК (МСК:МНК — 1:50, 1:10, 1:2, 1:1). Для стимуляции клеток использовали рекомбинантный IL-2 («Ронколейкин», ООО «Биотех», Россия; 100 ЕД/мл) и рекомбинантный IL-7 (R&D Systems, США; 10 нг/мл). Интенсивность пролиферации оценивали через 72 ч радиометрически по включению ^3H -тимидина, вносимого за 18 ч до окончания культивирования в дозе 1 мкКю/лунку. Об эффекте МСК судили по индексу влияния МСК (ИВ_{МСК}), который рассчитывали как отношение уровня пролиферативного ответа МНК в присутствии МСК к таковому без МСК.

Оценка клеточного цикла в субпопуляциях Т-лимфоцитов

Клеточный цикл оценивали перед (до начала кондиционирования) и после аутологичной трансплантации стволовых кроветворных клеток в день выхода из лейкопении (лейкоциты $> 1 \times 10^9/\text{л}$) в группе 8 пациентов со стандартной ауто-ТГСК (НХЛ — 4 человека, ЛХ — 1 и ММ — 3) и 13 пациентов с ко-трансплантацией МСК (НХЛ — 3, ЛХ — 2 и ММ — 8). Пациенты получали режимы кондиционирования BEAM (кармустин 300 мг/м², мелфалан 140 мг/м², этопозид и цитарабин по 800 мг/м²; $n = 10$) и мелфалан (140-200 мг/м²; $n = 11$). МСК вводили в средней дозе $0,48 \times 10^6$ клеток/кг веса больного ($0,10 - 1,23 \times 10^6$ клеток/кг). Период до выхода из лейкопении после ауто-ТГСК составил в среднем 14 дней (от 13 до 17 дней).

Параметры клеточного цикла определяли в субпопуляциях CD4⁺CD45RA⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RA⁺ и CD8⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur, США), используя FITC-меченые анти-CD4 и анти-CD8 и PE-меченые анти-CD45RO и анти-CD45RA моноклональные антитела («Сорбент», Россия; Becton Dickinson, США). Для этого меченые клетки последовательно обрабатывали РНКазой (20 мкг/мл) и 7-амино-актиномицином D (7-AAD, Calbiochem, Германия, 2 мкг/мл). Анализ гистограмм ДНК позволял идентифицировать апоптотические клетки (с фрагментированной ДНК), формирующие характерный гиподиплоидный пик; клетки в G₀/G₁ фазах клеточного цикла (с диплоидным набором ДНК) и клетки в S, G₂/M фазах клеточного цикла (с гипердиплоидным набором ДНК).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий между исследуемыми параметрами использовали не-

параметрический критерий Вилкоксона—Манна—Уитни. Для исследования корреляционных взаимосвязей использовался коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Для моделирования гомеостатической пролиферации *in vitro* МНК доноров активировали IL-2 или IL-7. Предварительные исследования показали, что наиболее выраженное усиление пролиферации МНК наблюдалось при использовании IL-2 в дозе 100 ЕД/мл и IL-7 — в дозе 10 нг/мл. Стимулирующий эффект IL-2 (ИВ_{IL-2}) составлял в среднем $10,2 \pm 2,4$, IL-7 — $2,26 \pm 0,6$ расч.ед. При этом обращала на себя внимание вариабельность ответа МНК. Так, ИВ_{IL-2} варьировал от 1,1 до 35,8, а ИВ_{IL-7} — от 0,5 до 4,2 расч. ед.

Исследование влияния МСК на пролиферативный ответ лимфоцитов в условиях, моделирующих гомеостатическую пролиферацию, показал (рис. 1), что МСК больных лимфомами обладали способностью усиливать пролиферативный ответ МНК доноров, стимулированных IL-2 или IL-7. Усиливающий эффект МСК в культурах IL-2-активированных МНК (Рис. 1А) проявлялся в достаточно широком диапазоне доз и был наиболее выраженным при соотношении МСК:МНК, равном 1:2, достигая 50%. Наибольший стимулирующий эффект в культурах IL-7-активированных МНК доноров (рис. 1Б) проявлялся в присутствии более низких доз МСК (МСК:МНК 1:50 и 1:10), составляя в среднем 70% и 170% соответственно. При максимальных дозах (при соотношении МСК:МНК = 1:1) МСК не влияли на интенсивность IL-2- и IL-7-стимулированной пролиферации лимфоцитов.

МСК проявляли регуляторную активность также в культурах МНК больных лимфомами. Однако в этом случае стимулирующий эффект МСК на IL-2-активированные клетки был максимально выраженным при низких дозах МСК и снижался по мере увеличения их количества. В то же время стимулирующий эффект МСК в IL-7-активированных культурах МНК больных (в отличие от эффекта в культурах МНК доноров) практически отсутствовал при низких дозах МСК, но отчетливо проявлялся при использовании более высоких доз, сохраняясь даже при соотношении МСК:МНК 1:1.

Важно отметить, что эффект МСК варьировал в зависимости от индивидуальных свойств МСК. Так, из 10 образцов МСК семь оказывали стимулирующее влияние на пролиферацию IL-2-активированных МНК доноров, тогда как МСК трех пациентов не проявляли подобной активно-

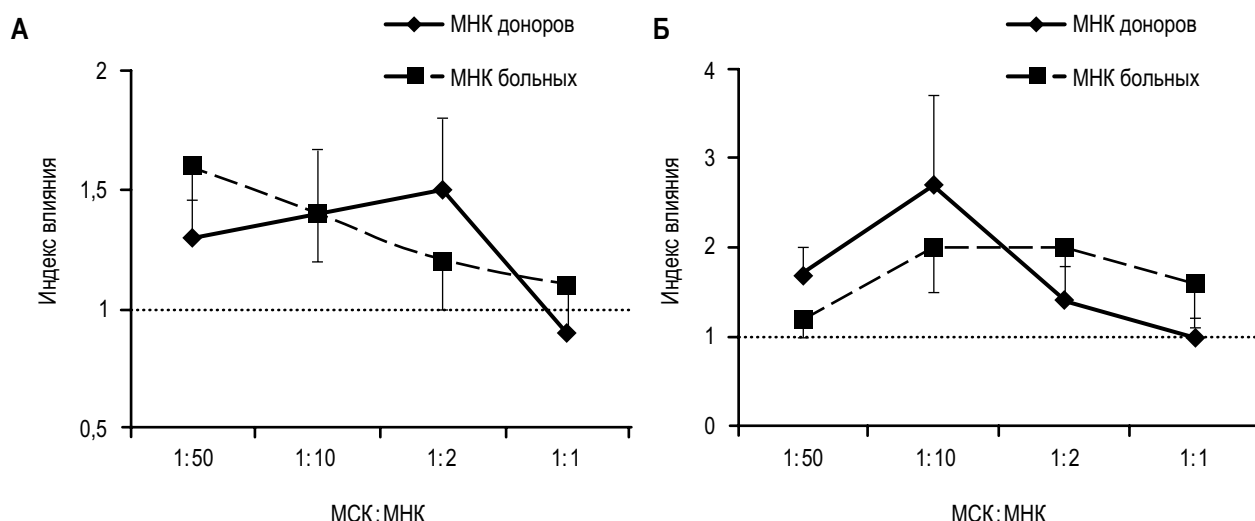


Рисунок 1. Влияние МСК на IL-2- и IL-7-стимулированную пролиферацию МНК

Примечание. А. МСК, полученные от 10 больных лимфомами, тестировали в культурах IL-2- стимулированных МНК здоровых доноров ($n = 23$) и больных ($n = 12$).

Б. МСК, полученные от 6 больных лимфомами, тестировали в культурах IL-7- стимулированных МНК здоровых доноров ($n = 7$) и больных ($n = 8$).

Данные представлены в виде средних значений $ИВ_{МСК}$.

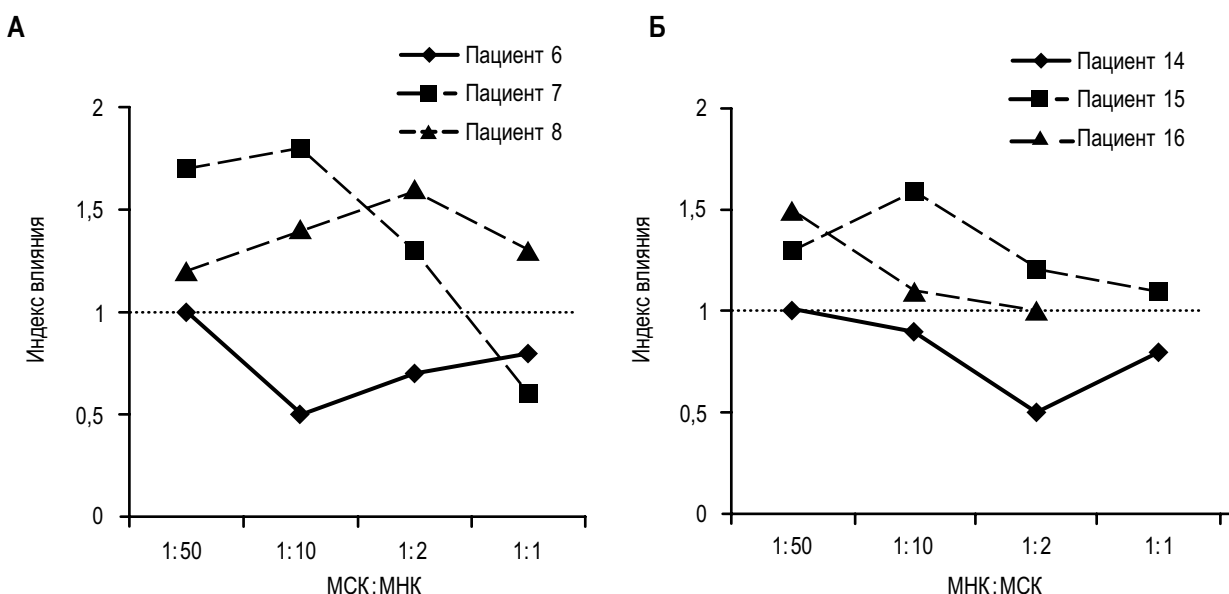


Рисунок 2. Вариабельность регуляторной активности МСК больных лимфомами

Примечание. Представлены значения $ИВ_{МСК}$ больных лимфомами ($n = 6$) на пролиферацию МНК одного донора при стимуляции IL-2 (А) и IL-7 (Б).

сти. Аналогичным образом, из 6 образцов МСК, тестируемых в культурах IL-7-активированных МНК, стимулирующий эффект был выявлен в 5 случаях. На рисунке 2 в качестве примера приведены результаты тестирования МСК шести пациентов в культуре МНК одного донора (рис. 2А, Б).

Стимулирующий эффект МСК зависел также от реактивности отвечающих лимфоцитов. Так, при соотношении МСК:МНК 1:2 пролиферативный ответ лимфоцитов на IL-2 в культурах с $ИВ_{МСК} > 1,0$ был достоверно ниже, чем в культурах МНК, в которых стимулирующее действие МСК не выявлялось (1994 ± 349 имп/мин против 5048 ± 1098 имп/мин, $p_U = 0,05$). Зависимость сти-

мулирующего эффекта МСК от реактивности лимфоцитов на ИЛ-2 подтверждалась также наличием обратной корреляционной связи между ИВ_{МСК} и уровнем ИЛ-2-стимулированной пролиферации МНК, наиболее выраженной при соотношении МСК:МНК 1:2 ($r_s = -0,6$; $p = 0,0024$, $n = 23$). Видимо, по этой же причине образцы МСК трех больных, не проявлявшие стимулирующей активности в культурах МНК доноров, усиливали пролиферативный ответ лимфоцитов больных. В качестве примера на рисунке 3 приведены данные, демонстрирующие отсутствие стимулирующего эффекта МСК одного из этих трех пациентов в культурах МНК двух доноров и появление стимулирующей активности в культурах МНК двух больных. Различия в эффекте МСК ассоциировались с различиями исходной реактивности МНК доноров и больных на ИЛ-2. Действительно, ответ МНК больных на ИЛ-2 был достоверно ниже по сравнению с МНК доноров (1879 ± 485 против 3322 ± 597 имп/мин, $p_U = 0,048$).

Стимулирующее влияние МСК в культурах ИЛ-7-активированных МНК больных также обратно коррелировало с уровнем ответа МНК на ИЛ-7. Эта взаимосвязь наиболее ярко проявлялась при соотношении МСК:МНК, равном 1:2 ($r_s = -0,74$, $p_s = 0,006$, $n = 12$).

Выявленная способность МСК усиливать ИЛ-2- и ИЛ-7-индуцированную пролиферацию лимфоцитов подтверждает предположение о том, что более эффективное восстановление лимфоцитов после ауто-ТГСК на фоне ко-трансплантации МСК может быть обусловлено усилением гомео-

статической пролиферации, являющейся основным механизмом восстановления лимфоцитов после высокодозной химиотерапии в раннем периоде. Для того чтобы убедиться в реализации стимулирующего эффекта МСК *in vivo* (в условиях индуцированной лимфопении), мы исследовали параметры клеточного цикла Т-лимфоцитов в группах пациентов со стандартной ауто-ТГСК (МСК-) и ко-трансплантацией МСК (МСК+) на этапе выхода из лейкопении.

Как видно из данных таблицы 1, после стандартной ауто-ТГСК наблюдалось выраженное возрастание апоптоза в популяции наивных $CD4^+$ Т-клеток, в то время как в группе МСК(+) значимого возрастания апоптоза $CD4^+CD45RA^+$ Т-лимфоцитов не регистрировалось. Второй особенностью в группе МСК(+) было значимое снижение доли покоящихся клеток и тенденция к возрастанию доли пролиферирующих клеток среди наивных $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Наконец, третьей особенностью в группе МСК(+) явилось значимое увеличение доли пролиферирующих и снижение доли покоящихся клеток в популяции $CD8^+$ Т-клеток памяти. Суммируя представленные данные, можно заключить, что ко-трансплантация МСК оказывала стимулирующий эффект на пролиферацию $CD8^+$ Т-клеток, тогда как более эффективное восстановление наивных $CD4^+$ Т-клеток в раннем посттрансплантационном периоде было связано с анти-апоптотическим эффектом МСК.

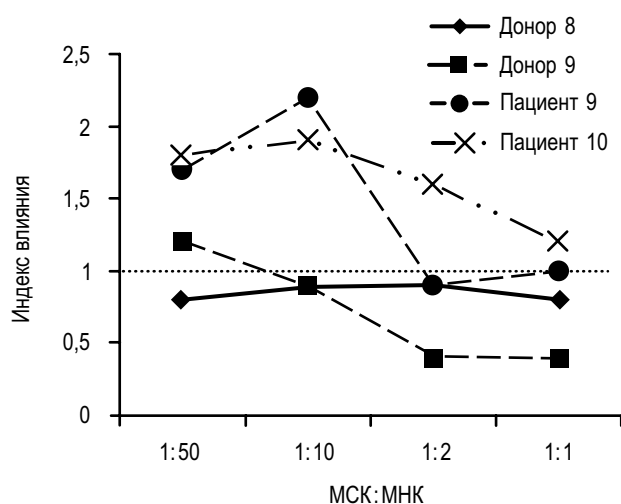


Рисунок 3. Эффект МСК в культурах МНК доноров и больных, оппози́тных по уровню исходной реактивности на ИЛ-2

Примечание. Представлены значения ИВ_{МСК} на пролиферацию МНК здоровых доноров ($n = 2$) и больных лимфомами ($n = 2$) в присутствии различных доз МСК одного пациента (пациент 8). Данные получены в ходе одного эксперимента.

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ СО СТАНДАРТНОЙ (МСК-) АУТО-ТГСК И КО-ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ МСК (МСК+)

Параметры	МСК (-), n = 7		МСК (+), n = 12	
	До АТГСК	После АТГСК	До АТГСК	После АТГСК
CD4⁺CD45RA⁺				
Апоптоз (%)	9,4±2,2	22,6±3,2**	10,0±1,6	14,0±3,0
G0/G1 (%)	56,5±3,1	51,0±6,0	58,0±4,8	59,3±5,0
S, G2/M	32,7±3,1	26,3±7,7	30,6±5,2	26,1±5,0
CD4⁺CD45RO⁺				
Апоптоз (%)	14,8±3,5	15,4±4,8	9,1±1,3	11,5±1,7
G0/G1 (%)	57,9±2,2	54,4±6,5	64,6±4,7	59,2±3,3
S, G2/M	27,1±3,3	30,9±5,3	27,0±4,4	29,1±2,7
CD8⁺CD45RA⁺				
Апоптоз (%)	14,1±3,4	19,1±5,1	14,4±1,8	16,2±3,0
G0/G1 (%)	50,2±4,0	45,7±2,4	58,5±3,7	45,0±3,6*
S, G2/M	34,8±4,9	36,1±4,0	26,8±2,9	37,4±4,9
CD8⁺CD45RO⁺				
Апоптоз (%)	9,3±1,6	16,3±4,7	14,5±2,3	14,8±2,1
G0/G1 (%)	57,2±6,4	49,1±6,7	62,3±4,1	45,6±3,4**
S, G2/M	35,0±5,8	34,9±4,8	23,5±4,9	39,3±3,9*

Примечание. * – $p_U < 0,05$; ** – $p_U < 0,01$; U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

Обсуждение

Полученные данные впервые продемонстрировали, что МСК больных лимфомами способны усиливать *in vitro* пролиферацию лимфоцитов, активированных IL-2 или IL-7. Стимулирующий эффект МСК регистрируется в достаточно широком диапазоне соотношений МСК:МНК – от 1:50 до 1:2 и воспроизводится как в культурах МНК доноров, так и больных лимфомами. При этом важным фактором, детерминирующим стимулирующий эффект МСК, является исходная реактивность отвечающих лимфоцитов на IL-2 или IL-7.

Как известно, IL-7 является основным цитокином, участвующим в поддержании гомеостатической пролиферации лимфоцитов [13]. Кроме того, в ряде работ описана возможность запуска и поддержания периферической экспансии CD8⁺ (но не CD4⁺) Т-клеток под влиянием IL-2, что может быть связано с экспрессией на CD8⁺ клетках β-цепи общего для IL-2 и IL-15 рецептора (CD122), практически отсутствующего на CD4⁺ лимфоцитах [10, 15, 24]. Учитывая эти факты, выявленная нами способность МСК стимулировать IL-2- и IL-7-индуцированную пролиферацию лимфоцитов *in vitro* подтверждает гипотезу о возможном участии МСК в регуляции гомеостатической пролиферации лимфоцитов.

Стимулирующий эффект низких доз МСК здоровых доноров на пролиферацию лимфоцитов, индуцированную митогенами или аллоантигенами, был описан рядом авторов [18, 21]. Более того, Bocelli-Tyndall с соавт. продемонстрировали, что низкие дозы МСК могут усиливать экспансию лимфоцитов, слабо отвечающих на «гомеостатические» цитокины. Однако при увеличении соотношения МСК:МНК проявляется супрессорный эффект МСК [6]. В своей работе мы использовали МСК больных лимфомами, отличительной особенностью которых является, как было показано ранее, сниженный иммуносупрессорный потенциал [23]. Видимо, поэтому МСК больных даже в относительно высоких дозах (при соотношении МСК:МНК, равном 1:2) не проявляли супрессорной активности.

Важно отметить, что позитивный эффект МСК на пролиферацию лимфоцитов в условиях стимуляции IL-2 и IL-7 наиболее ярко проявлялся в культурах МНК с низкой реактивностью к указанным цитокинам. При этом в культурах с высоким уровнем IL-2- и IL-7-индуцированной пролиферации МСК не обладали стимулирующим эффектом и в ряде случаев даже ингибировали пролиферативный ответ лимфоцитов. Подобная избирательность эффектов МСК, вероятно, направлена на поддержание иммунного гомеостаза и обусловлена способностью МСК продуцировать медиаторы как со стимулирующей, так и су-

прессорной активностью, а также индуцировать генерацию $CD4^+CD25^{hi}CD127^-FoxP3^+$ регуляторных Т-клеток [11].

Важным результатом настоящего исследования можно считать также данные о влиянии МСК на уровень апоптоза и пролиферацию Т-лимфоцитов *in vivo*. Результаты этих исследований показали, что у пациентов с ко-трансплантацией МСК $CD8^+$ Т-клетки, особенно Т-клетки памяти, на этапе выхода из лейкопении содержат большую долю пролиферирующих клеток, чем до ауто-ТГСК, тогда как в группе со стандартной трансплантацией подобных различий не наблюдалось. В то же время более эффективное восстановление наивных $CD4^+$ Т-

клеток в группе с ко-трансплантацией МСК, показанное нами ранее [1], не связано с увеличением пролиферации $CD4^+CD45RA^+$ клеток, а обусловлено анти-апоптотическим эффектом МСК.

В целом результаты настоящей работы позволяют полагать, что МСК больных лимфомами способны оказывать стимулирующий эффект на гомеостатическую пролиферацию лимфоцитов, и данный эффект проявляется *in vivo* прежде всего в отношении $CD8^+$ Т-клеток. В то же время позитивный эффект МСК на раннее восстановление наивных $CD4^+$ Т-клеток обусловлен более высокой выживаемостью этих клеток вследствие снижения их апоптоза.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00107.

Список литературы

1. Черных Е.Р., Баторов Е.В., Шевела Е.Я., Пронкина Н.В., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Гилевич А.В., Баранова Д.С., Кожевников В.С., Останин А.А. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на раннее восстановление Т-лимфоцитов у больных злокачественными лимфомами с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток // Иммунология. — 2013. — Т. 34, № 4. — С. 202-207.
2. Черных Е.Р., Баторов Е.В., Шевела Е.Я., Пронкина Н.В., Сергеевичева В.В., Гилевич А.В., Баранова Д.С., Останин А.А., Крючкова И.В. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на раннее восстановление лимфоцитов у больных злокачественными лимфомами с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток // Бюллетень СО РАМН. — 2011. — Т. 31, № 2. — С. 101-107.
3. Шевела Е.Я., Петровский Я.Л., Курганова Е.В., Тихонова М.А., Сахно Л.В., Сергеевичева В.В., Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у больных гемобластозами // Гематология и трансфузиология. — 2008. — № 2. — С. 32-38.

Ссылки 4-24 см. в References (см. 147-148). See References for numbers 4-24 at pp. 147-148.

References

1. Chernykh E.R., Batorov E.V., Shevela E.Ya., Pronkina N.V., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Gilevich A.V., Baranova D.S., Kozhevnikov V.S., Ostanin A.A. Vliyanie mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok na rannee vosstanovlenie T-limfotsitov u bol'nykh zlokachestvennymi limfomami s autologichnoy transplantatsiey gemopoeticheskikh stvolovykh kletok [Effect of mesenchymal stromal cells on the early reconstitution of T-lymphocytes in malignant lymphoma patients with autologous hematopoietic stem cell transplantation]. *Immunologiya — Immunology*, 2013, vol. 34, no. 4, pp. 202-207.
2. Chernykh E.R., Batorov E.V., Shevela E.Ya., Pronkina N.V., Sergeevicheva V.V., Gilevich A.V., Baranova D.S., Ostanin A.A., Kryuchkova I.V. Vliyanie mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok na rannee vosstanovlenie limfotsitov u bol'nykh zlokachestvennymi limfomami s autologichnoy transplantatsiey gemopoeticheskikh stvolovykh kletok [Effect of mesenchymal stromal cells on the early lymphocyte recovery in patients receiving autologous hematopoietic stem cell transplantation for malignant lymphomas]. *Byulleten' SO RAMN — Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2011, vol. 31, no. 2, pp. 101-107.
3. Shevela E.Ya., Petrovskiy Ya.L., Kurganova E.V., Tikhonova M.A., Sakhno L.V., Sergeevicheva V.V., Kulagin A.D., Lisukov I.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Harakteristika mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok kostnogo mozga u bol'nykh gemoblastozami [Characteristics of bone marrow mesenchymal stromal cells in patients with hematological malignancies]. *Gematologiya i transfuziologiya — Haematology and Transfusiology*, 2008, no. 2, pp. 32-38.

4. Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H., Lankester A., Cometa A., Egeler R.M., Locatelli F., Fibbe W.E. Co-transplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocytes recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2007, vol. 110, pp. 2764-2767.
5. Ben-Ami E., Berrih-Akhin S., Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2011, vol. 10, no. 7, pp. 410-405.
6. Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Schaeren S., Feder-Mengus C., Barbero A., Tyndall A., Spagnoli G.C. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the *in vitro* proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. *Ann. Rheum. Dis.*, 2009, vol. 68, pp. 1352-1359.
7. Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Spagnoli G., Braccini A., Bouchenaki M., Ceredig R., Pistoia V., Martin I., Tyndall A. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and autoimmune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes *in vitro*. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, vol. 46, no. 3, pp. 403-408.
8. Boyman O., L'heureux S., Kreig C., Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2009, vol. 39, no. 8, pp. 2088-2094.
9. Caplan A.I., Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.*, 2006, vol. 98, pp. 1076-1084.
10. Cho J.H., Boyman O., Kim H.O., Hahm B., Rubinstein M.P., Ramsey C., Kim D.M., Surh C.D., Sprent J. An intense form of homeostatic proliferation of naïve CD8⁺ cells driven by IL-2. *J. Exp. Med.*, 2007, vol. 204, no. 8, pp. 1787-1801.
11. Crop M.J., Baan C.C., Korevaar S.S., Ijzermans J.N., Weimar W., Hoogduijn M.J. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev.*, 2010, vol. 19, no. 12, pp. 1843-1853.
12. Fekete N., Gadelorge M., Fürst D., Maurer C., Dausend J., Fleury-Cappellesso S., Mailänder V., Lotfi R., Ignatius A., Sensebé L., Bourin P., Schrezenmeier H., Rojewski M.T. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*, 2012, vol. 14, no. 5, pp. 540-554.
13. Fry T.J., Connick E., Fallon J., Lederman M.M., Liewehr D.J., Spritzler J., Steinberg S.M., Wood L.V., Yarchoan R., Zuckerman J., Landay A., Mackall C.L. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood*, 2001, vol. 97, no. 10, pp. 2983-2990.
14. Isaikina Y., Minakovskaya N., Aleinikova O. The influence of autologous marrow mesenchymal stem cell infusion on hematopoiesis reconstitution after hematopoietic stem cells autotransplantation in children with oncological and hematological diseases. *Cellular Therapy and Transplantation*, 2008, vol. 1, no. 1, pp. 35-42.
15. Kamimura D., Bevan M.J. Naïve CD8⁺ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2007, vol. 204, no. 8, pp. 1803-1812.
16. Kim J., Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp. Hematol.*, 2009, vol. 37, pp. 1445-1453.
17. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., Ljungman P., Lönnies H., Nava S., Ringden O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 2007, vol. 21, no. 8, pp. 1733-1738.
18. Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S.E., Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.*, 2003, vol. 57, pp. 11-20.
19. Li W., Ren G., Huang Y., Su J., Han Y., Li J., Chen X., Cao K., Chen Q., Shou P., Zhang L., Yuan Z.R., Roberts A.I., Shi S., Le A.D., Shi Y. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death & Differentiation*, 2012, vol. 19, pp. 1505-1513.
20. Mackall C.L., Hakim F.T., Gress R.E. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Immunology*, 1997, vol. 9, pp. 339-346.
21. Najar M., Rouas R., Raicevic G., Boufker H.I., Lewalle P., Meuleman N., Bron D., Tougouz M., Martiat P., Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy*, 2009, vol. 11, no. 5, pp. 570-583.

22. Sergeevicheva V.V., Shevela E.Ya., Sizikova S.A., Kulagin A.D., Kruchkova I.V., Gilevich A.V., Lisukov I.A., Kozlov V.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Autologous mesenchymal stromal cells of hemoblastoses patients efficiently support hematopoietic recovery stem cell transplantation. *Cellular Therapy and Transplantation*, 2010, vol. 1, no. 4, pp. 98-105.
23. Shevela E.Ya., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Sergeevicheva V.V., Kryuchkova I.V., Kozlov V.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Impaired Functions of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Hematological Malignancies are Partially Improved by Fibroblast Growth Factor. *J. Stem. Cell Res. Ther.*, 2013, vol. 3:137. doi: 10.4172/2157-7633.1000137.
24. Sprent J., Surh C.D. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat. Immunol.*, 2011, vol. 12, no. 6, pp. 478-484.