

КАПРАНОВ НИКОЛАЙ МИХАЙЛОВИЧ

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ЛИМФОЦИТАМИ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук **Дризе Нина Иосифовна**

Официальные оппоненты:

Андреева Елена Ромуальдовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ-ИМБП РАН)

Астрелина Татьяна Алексеевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой регенеративной медицины, гематологии, молекулярной цитогенетики с курсом педиатрии в медико-биологическом университете инноваций и непрерывного образования Государственного научного центра Российской Федерации Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России (МБУ ИНО ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России)

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» апреля 2020 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 208.135.03 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу:

125167 г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.blood.ru.

Автореферат разослан « » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В костном мозге присутствуют два различных типа стволовых клеток – стволовые кроветворные клетки (СКК) и мезенхимные стволовые клетки. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) – потомки мезенхимных стволовых клеток, выявляемые в системе *in vitro*. МСК формируют стромальное микроокружение и локализуются в «нишах» костного мозга, поддерживающих и регулирующих СКК. МСК характеризуются способностью к дифференцировке *in vitro* в адипоциты, хондроциты и остеобласты под действием ростовых факторов. МСК впервые были выделены из костного мозга, но впоследствии клетки с аналогичными свойствами были выявлены и в других тканях, например, в жировой ткани, амниотической жидкости, зубной ткани, пуповинной крови. В настоящее время наибольшее количество работ посвящено исследованию свойств МСК, выделенных из костного мозга.

Способность оказывать ингибирующее воздействие на развитие иммунного ответа делает возможным применение МСК для лечения и профилактики различных иммунных осложнений, связанных с трансплантацией органов. Посттрансплантационные осложнения связаны с развитием иммунных реакций между клетками донора и реципиента. В случае пересадки солидных органов иммунные клетки реципиента начинают атаковать аллогенные по отношению к ним клетки трансплантата, что индуцирует его отторжение. В случае трансплантации аллогенного костного мозга клетки донора в некоторых случаях атакуют различные ткани реципиента, что приводит к развитию реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Для предотвращения подобных осложнений применяется комплексная иммуносупрессивная терапия.

Применение МСК может способствовать ингибированию иммунного ответа и индуцировать развитие иммунологической толерантности. Данные об эффективности применения МСК противоречивы. Не аутологичные МСК становятся иммуногенными при введении пациентам, что может, наоборот, привести к развитию или усилению иммунологического ответа против алло-антигенов.

Иммуномодулирующие свойства МСК могут быть усилены различными цитокинами, в частности интерфероном гамма. Обработанные интерфероном гамма МСК начинают экспрессировать на поверхности молекулы HLA-DR.

Актуальность исследования взаимодействия МСК с лимфоцитами крови человека обусловлена в первую очередь противоречивостью результатов использования МСК в качестве иммуносупрессивной терапии, применяемой при лечении и профилактике различных иммунных осложнений, связанных с трансплантацией органов. Требуют дополнительного

изучения механизмы и условия изменения иммуногенности МСК, а также способы усиления иммуномодулирующих свойств МСК.

Так как оценить свойства МСК после их введения в организм не представляется возможным, для исследования МСК применяются различные *in vitro* модели. Для оценки иммуномодулирующих свойств МСК сокультивируют с активированными и неактивированными Т-клетками. Изменения свойств МСК после взаимодействия с активированными и неактивированными лимфоцитами, вероятно, отражают то, что происходит с МСК после попадания в организм. Такая система может рассматриваться как адекватная *in vitro* модель для изучения механизмов иммуномодуляции.

Цель исследования

Определение взаимовлияния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и лимфоцитов *in vitro* при сокультивировании.

Задачи исследования

1. Определить иммунофенотип МСК после взаимодействия с неактивированными и активированными лимфоцитами.
2. Сравнить иммунофенотип МСК, культивированных с аллогенными и аутологичными лимфоцитами.
3. Изучить субпопуляционный состав культур лимфоцитов при взаимодействии с МСК.
4. Исследовать иммунофенотип МСК после активации с помощью интерферона гамма и взаимодействия с лимфоцитами и охарактеризовать субпопуляционный состав культур лимфоцитов при взаимодействии с обработанными интерфероном гамма МСК.
5. Оценить индивидуальные иммуносупрессивные свойства МСК, полученных от различных доноров костного мозга.

Научная новизна

Проведенные исследования показали, что в системе *in vitro* МСК ингибируют пролиферацию лимфоцитов, и была детально изучена динамика изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, сокультивированных с МСК. В настоящей работе впервые для МСК костного мозга человека охарактеризована динамика изменения уровня экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости, а также линейно-специфичных молекул, при культивировании их в различных условиях в течение четырёх суток.

Впервые было проведено детальное сравнение воздействия активированных с помощью ИФН- γ и неактивированных МСК на субпопуляции лимфоцитов. Проведение этого исследования позволило лучше понять изменения, происходящие с МСК, при их

внутривенном введении, а также то, к каким изменениям приводит их взаимодействие с лимфоцитами крови.

В ходе проведенных исследований получены данные о наличии индивидуальных особенностей МСК разных доноров, с которыми связано выраженное различие в их влиянии на субпопуляционный состав лимфоцитов.

Практическая значимость

Проведенное исследование степени иммуногенности МСК в различных условиях, а также эффекта, оказываемого МСК по отношению к лимфоцитам, может стать основой для разработки и внедрения соответствующей методики подбора МСК, наиболее эффективно проявляющих иммуномодулирующие свойства при их применении.

Положения, выносимые на защиту

1. Взаимодействие лимфоцитов с МСК изменяет их иммунофенотип. Изменяется экспрессия маркеров МСК и антигенов гистосовместимости.
2. МСК ингибируют активацию лимфоцитов, что выражается в снижении экспрессии на их поверхности антигенов CD25, CD69, PD-1, HLA-DR, и препятствуют переходу клеток из наивного в эффекторное состояние.
3. Обработка МСК интерфероном гамма не оказывает существенного влияния на иммуносупрессивные свойства МСК.
4. МСК доноров костного мозга различаются по иммуносупрессирующим свойствам.

Внедрение результатов исследования

Апробация

Полученные результаты были представлены на ведущих отечественных и зарубежных конгрессах и конференциях в виде стендовых докладов: 58th, 59th ASH Annual Meeting (2016, 2017), 22nd, 23rd Congress of EHA (2017, 2018), Конгресс гематологов 2016, X, XI симпозиум памяти Р.М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия» (2016, 2017), конгресс по регенеративной медицине 2017.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в журнале индексированном в **researchgate.net**, 7 тезисов.

Объём и структура работы

Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы».

Текст диссертации изложен на 118 страницах, содержит 38 рисунков и 21 таблицу. Список литературы состоит из 200 цитируемых источников на иностранном языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка образцов МСК и лимфоцитов. В работе использовали образцы костного мозга (КМ) 27 здоровых доноров (15 мужчин и 12 женщин) в возрасте 12-62 лет (медиана возраста 31 год). Все образцы были получены во время эксфузии КМ в отделении высокодозной химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ после подписания донорами информированного согласия.

Выделение и культивирование МСК проводили в лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (заведующая д.б.н. Дризе Н.И.).

В экспериментальные флаконы с площадью дна 25 см² рассаживали по 10⁵ МСК, полученных на 2-3 пассаже. Для активации МСК в экспериментальные флаконы добавляли 500 ЕД/мл интерферона гамма, культивировали на протяжении 4-х часов в инкубаторе с 5% СО₂ при +37° С, после чего отмывали флаконы и использовали обработанные МСК (γ-МСК) в экспериментах по сокультивированию с лимфоцитами.

Для получения мононуклеарных клеток из периферической крови здоровых доноров использовали стандартный протокол. После выделения мононуклеаров в их суспензию добавляли диметилсульфоксид с 20% эмбриональной телячьей сывороткой в соотношении 1:1 и замораживали при температуре -70° С. Для экспериментов использовались размороженные мононуклеары. В дальнейшем вместо термина мононуклеары используется термин – лимфоциты.

Во всех экспериментах использовались лимфоциты от одного стороннего донора, однако в ряде экспериментов использовались дополнительно аутологичные лимфоциты, полученные от доноров МСК (n = 5).

В экспериментальные флаконы с МСК и МСК, обработанными интерфероном гамма, помещали лимфоциты в количестве 1×10⁶. Для активации лимфоцитов в часть сокультур добавляли 5 мг/мл фитогемагглютинаина (ФГА). Сокультивирование продолжалось до 4 дней с 5% СО₂ при +37° С.

Для исследования динамики изменения в культурах МСК и лимфоцитов анализ культур проводили ежедневно – после 1-х, 2-х, 3-х, 4-х суток инкубации (для 13 образцов); через сутки и 4-ро суток (для 12 образцов), через 4-ро суток культивирования (3 образца).

Иммунофенотипирование с помощью проточной цитофлуориметрии.

Иммунофенотипическое исследование проводилось как для МСК, так и для лимфоцитов. Для иммунофенотипического исследования использовался проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II. Анализ полученных данных проводили с помощью программы BD FACS Diva (v6.1, Becton Dickinson, США), FlowJo (v7.6, FlowJo, LLC, США).

Иммунофенотипическое исследование МСК.

Для иммунофенотипирования МСК использовали моноклональные антитела (мАТ), меченные флуорохромными красителями: HLA-ABC, CD80, PD-L1, CD105, меченные FITC; CD90, CD146, CD73, меченными PE, HLA-DR, FAS-L (CD178), CD54, CD86, меченные APC. Из каждого образца отбирали для окрашивания $7-10 \times 10^3$ клеток и инкубировали их с антителами в течение 15 минут в темноте при $+4^\circ\text{C}$. Оценивали среднюю интенсивность флуоресценции по каналам FITC, PE, APC.

Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов.

Цитометрический анализ маркеров активации лимфоцитов проводили с помощью моноклональных антител, к антигенам дифференцировки: CD38, CD25, CD69 (меченых FITC); CD127 PE, CD8 PerCP-Cy5.5, HLA-DR APC, CD4 APC-Cy7, CD279 PE-Cy7. Определяли долю CD4^+ или CD8^+ лимфоцитов, экспрессирующих CD25, CD38, CD69, PD-1, HLA-DR. В культурах неактивированных лимфоцитов определяли также количество регуляторных Т-клеток ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^-$).

Анализ субпопуляций наивных, эффекторных и клеток памяти среди лимфоцитов.

Анализ различных субпопуляций Т-лимфоцитов заключался в определении доли наивных (NV), стволовых клеток центральной памяти (SCM), клеток центральной памяти (CM), эффекторных клеток памяти (EM), терминальных клеток памяти (TM), терминальных эффекторных клеток (TE) как среди CD4^+ , так и среди CD8^+ клеток. Распределение субпопуляций анализировалось в зависимости от экспрессии на клетках CD28, CD45RO, CD95 и CD197.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка результатов и построение графиков были выполнены в программе GraphPad Prism.

Для всех изучаемых выборок по каждому из параметров была проведена проверка данных на нормальность распределения значений с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Для сравнения данных, распределенных нормально, применялись параметрические критерии (непарный и парный критерий Стьюдента, а также одномерный дисперсионный анализ (ANOVA)). Для данных, распределенных ненормально, применялись непараметрические критерии (критерии Манна-Уитни и Уилкоксона для непарных и парных сравнений двух групп и одномерный дисперсионный анализ с помощью критерия Краскела-

Уоллиса). При использовании одномерного дисперсионного анализа вводилась поправка Бонферрони на множественные сравнения. Статистически значимыми принимались отличия при $p < 0,05$.

Сравнение контрольной и опытных групп экспериментов проводили с помощью непарных критериев. В рамках одной группы сравнение изменений с течением времени проводили с помощью парных критериев. Изменения средней интенсивности флуоресценции (далее по тексту СИФ) на обработанных и необработанных МСК оценивали также с помощью парных критериев.

В связи с тем, что 80% представленных в таблицах и на рисунках данных распределены нормально, данные на графиках и в таблицах представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение экспрессии антигенов на поверхности МСК после взаимодействия с лимфоцитами

При культивировании МСК различных доноров средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) CD90 на протяжении 4х суток не изменялась. При сокультивировании МСК с неактивированными лимфоцитами отмечается достоверное снижение экспрессии CD90 уже через двое суток, сохраняющееся на протяжении всего сокультивирования: СИФ снизилась в 1,3 ($p = 0,02$), 1,4 ($p = 0,02$) и 1,4 ($p = 0,04$) раза через двое, трое и четверо суток сокультивирования соответственно (Рисунок 1 А).

При сокультивировании МСК с ФГА-лимфоцитами обнаруживается снижение экспрессии CD90 к четвёртым суткам (СИФ снизилась в 1,1, 1,3 и 1,9 ($p < 0,0001$) раз через двое, трое и четверо суток), притом снижение более выраженное, чем при сокультивировании с неактивированными лимфоцитами (Рисунок 1 А).

Через сутки культивирования отмечается достоверное снижение уровня экспрессии CD105 при сокультивировании как с неактивированными (в 1,3 раза $p = 0,022$), так и с ФГА-лимфоцитами (в 1,5 раза, $p = 0,006$) (Рисунок 1 Б).

Было обнаружено, что CD54 и CD146 экспрессируются на МСК, культивированных как с лимфоцитами, так и без них. СИФ и CD54, и CD146 достоверно выше, чем СИФ ИК. Не было обнаружено увеличения доли CD54⁺ МСК в процессе культивирования: процент этих клеток сохранялся как при культивировании без лимфоцитов, так и при сокультивировании с активированными и неактивированными лимфоцитами. Однако было обнаружено достоверно

большее относительное количество CD54⁺ МСК в культурах с лимфоцитами по сравнению с контрольными МСК ($p < 0,0005$ для не активированных лимфоцитов и $p < 0,0001$ для ФГА-лимфоцитов). Интенсивность флуоресценции CD54 изменялась аналогичным образом (Рисунок 1 В, Г).

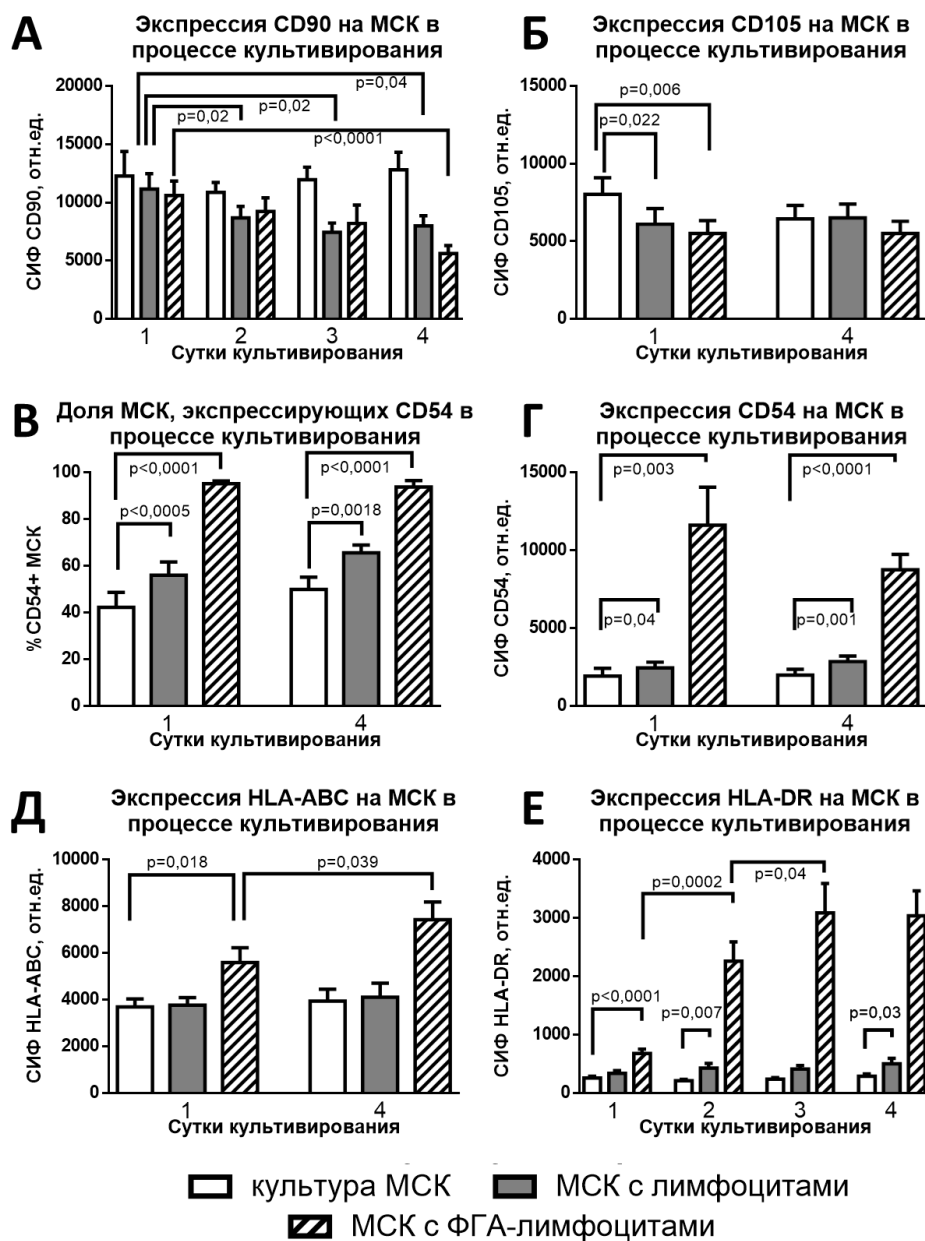


Рисунок 1. Экспрессия маркеров CD90, CD105, CD54, HLA-ABC, HLA-DR на МСК в процессе культивирования.

А – изменение экспрессии CD90; Б – изменение экспрессии CD105; В – изменение доли клеток, экспрессирующих CD54; Г – изменение экспрессии CD54; Д – изменение экспрессии HLA-ABC; Е – изменение экспрессии HLA-DR.

Выявлено достоверное (в 1,5 раза, $p = 0,018$) увеличение экспрессии HLA-ABC на МСК, взаимодействующих с активированными лимфоцитами, через сутки сокультивирования.

Нарастание экспрессии продолжалось, и к четвёртым суткам СИФ увеличилась в 2 раза ($p = 0,001$) по сравнению с исходными образцами и в 1,3 раза ($p = 0,039$) по сравнению с первыми сутками сокультивирования МСК с ФГА-лимфоцитами (Рисунок 1 Д).

Экспрессия HLA-DR при культивировании МСК без лимфоцитов не увеличивалась. При сокультивировании МСК с лимфоцитами экспрессия HLA-DR увеличилась в 2 раза через двое суток сокультивирования ($p = 0,007$) и далее не изменялась. Экспрессия HLA-DR при сокультивировании МСК с ФГА-лимфоцитами увеличилась в 2,6 раза уже через сутки ($p < 0,0001$). Дальнейшее нарастание экспрессии происходило до третьих суток ($p = 0,0002$ и $p = 0,04$): экспрессия HLA-DR была выше контрольной в 8,7 ($p < 0,0001$) и 11,9 ($p < 0,0001$) раз через двое и трое суток сокультивирования, соответственно (Рисунок 1 Е).

Обнаруженные изменения иммунофенотипа МСК указывают на то, что после взаимодействия с лимфоцитами увеличивается иммуносупрессивный потенциал МСК, однако, клетки становятся иммуногенными. Таким образом, в большинстве случаев предпочтительно использование аутологичных МСК, не способных вызвать иммунологические реакции, в качестве терапии.

Изменение субпопуляций лимфоцитов после взаимодействия с МСК

Т-клетки были проанализированы в зависимости от стадии дифференцировки, включающие наивные клетки, стволовые клетки центральной памяти, клетки центральной памяти, эффекторные клетки памяти, транзиторные клетки памяти и терминальные эффекторные клетки, на основании экспрессии на них антигенов CD28, CD95, CD45RO и CD197. Также определяли долю Т-клеток, экспрессирующих маркеры активации Т-лимфоцитов: CD25, CD69, CD38, PD-1 и HLA-DR и количество регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^+CD127^-$).

Достоверные изменения были обнаружены для доли $CD4^+$ наивных и эффекторных клеток памяти. При изучении пропорции наивных Т-клеток в культуре оказалось, что к четвертым суткам инкубации в популяции культивируемых лимфоцитов снижается пропорция наивных $CD4^+$ клеток (с $49,9 \pm 1,5\%$ до $36,2 \pm 1,5\%$, $p = 0,003$). При этом в контрольных культурах лимфоцитов к четвертым суткам увеличивается количество $CD4^+$ эффекторных клеток памяти (с $19,6 \pm 1,4\%$ до $29,8 \pm 1,6\%$, $p = 0,0002$).

Было обнаружено, что при сокультивировании лимфоцитов с МСК на протяжении 4-х суток наблюдается последовательное увеличение доли $CD4^+HLA-DR^+$ (с $5,6 \pm 0,6\%$ до $15,4 \pm 2,1\%$, $p = 0,001$) и $CD8^+HLA-DR^+$ (с $8,7 \pm 0,9\%$ до $25,7 \pm 4,3\%$, $p = 0,002$) клеток.

При активации лимфоцитов с помощью ФГА происходят значительные субпопуляционные изменения. Уже через сутки после добавления ФГА отмечалось значительное снижение доли наивных клеток $CD4^+$ и $CD8^+$, которое продолжалось по мере культивирования. После 4-х суток доля $CD4^+$ клеток уменьшалась с $18,4 \pm 4,6$ до $7,7 \pm 6,3\%$ ($p = 0,016$), а доля $CD8^+$ клеток – в 1,5 раза (с $13,5 \pm 4,5\%$ до $5,3 \pm 4,8\%$, $p = 0,027$). При сокультивировании ФГА-лимфоцитов с МСК процент наивных клеток был достоверно выше на первые сутки ($32,1 \pm 1,6\%$ против $18,4 \pm 4,6\%$, $p = 0,031$) для $CD4^+$, а к 4-м суткам количество наивных клеток снижалось, но оставалось достоверно выше, чем для контрольных лимфоцитов ($17,5 \pm 4,5\%$ против $7,7 \pm 6,3\%$, $p = 0,011$ для $CD4^+$ клеток и $10,6 \pm 3,2\%$ против $5,3 \pm 4,8\%$, $p = 0,018$ для $CD8^+$ клеток).

Количество $CD8^+$ клеток центральной памяти при сокультивировании ФГА-лимфоцитов с МСК было достоверно ниже, чем в контрольных культурах через 4 суток инкубации ($27,2 \pm 4,2\%$ против $60,2 \pm 6,2\%$, $p < 0,05$).

Доля $CD8^+$ EM-клеток по мере культивирования без МСК снижалась с $10,2 \pm 0,8\%$ до $6,8 \pm 1,1\%$ ($p = 0,02$), однако, при сокультивировании с МСК их количество к 4 суткам увеличивалось с $7,9 \pm 0,5\%$ до $13,8 \pm 1,7\%$ ($p < 0,03$).

Доля $CD4^+CD25^+$ клеток в культуре ФГА-лимфоцитов увеличивалась (с $65,2 \pm 8,1\%$ до $94,6 \pm 1,4\%$, $p = 0,001$) с 1-х по 4-е сутки культивирования. При сокультивировании с МСК процент этих клеток был достоверно ниже, чем в контрольной культуре через сутки ($38,2 \pm 2,4\%$, $p = 0,005$). Процент $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов увеличивался в процессе культивирования до $64,0 \pm 7,3\%$ к 4-м суткам, но был в 1,5 раза меньше, чем при культивировании без МСК ($p = 0,0002$) (Рисунок 2А).

Доля $CD8^+CD25^+$ клеток в культуре ФГА-лимфоцитов увеличивалась с $56,6 \pm 8,2\%$ до $93,2 \pm 0,7\%$ ($p = 0,0001$) с 1-х по 4-е сутки культивирования. В культуре ФГА-лимфоцитов, сокультивированных с МСК, доля этих клеток была достоверно ниже, чем в контрольных образцах через сутки ($20,3 \pm 3,0\%$, $p = 0,001$), а затем доля также нарастала. Через 4 суток сокультивирования с МСК процент $CD8^+CD25^+$ лимфоцитов составлял $66,0 \pm 7,6\%$, что в 1,5 раз меньше, чем при культивировании без МСК ($p = 0,0001$) (Рисунок 2Б).

Доля $CD4^+PD-1^+$ клеток в культуре ФГА-лимфоцитов при культивировании без МСК возрастала по мере культивирования (с $35,3 \pm 4,5\%$ до $83,4 \pm 2,8\%$, $p < 0,0001$). Аналогичная картина наблюдалась в первые двое суток при сокультивировании ФГА-лимфоцитов с МСК, однако в дальнейшем количество $CD4^+PD-1^+$ не возрастало, и было существенно ниже, чем в культуре ФГА-лимфоцитов на 4-е сутки ($51,7 \pm 5,6\%$, $p < 0,0001$) (Рисунок 2В). Процент $CD8^+PD-1^+$ клеток в культуре ФГА-лимфоцитов также возрастал в течение двух суток (с $21,6 \pm 3,8\%$ до $53,3 \pm 7,8\%$, $p < 0,0001$), а затем не изменялся. Сокультивирование

ФГА-лимфоцитов с МСК приводило к уменьшению доли $CD8^+PD-1^+$ через сутки в 2 раза по сравнению с контролем ($p = 0,001$), а через четверо суток их доля составляла $18,1 \pm 2,8\%$, что в 2,5 раза меньше, чем при культивировании ФГА-лимфоцитов без МСК ($p < 0,0001$) (Рисунок 2 Г).

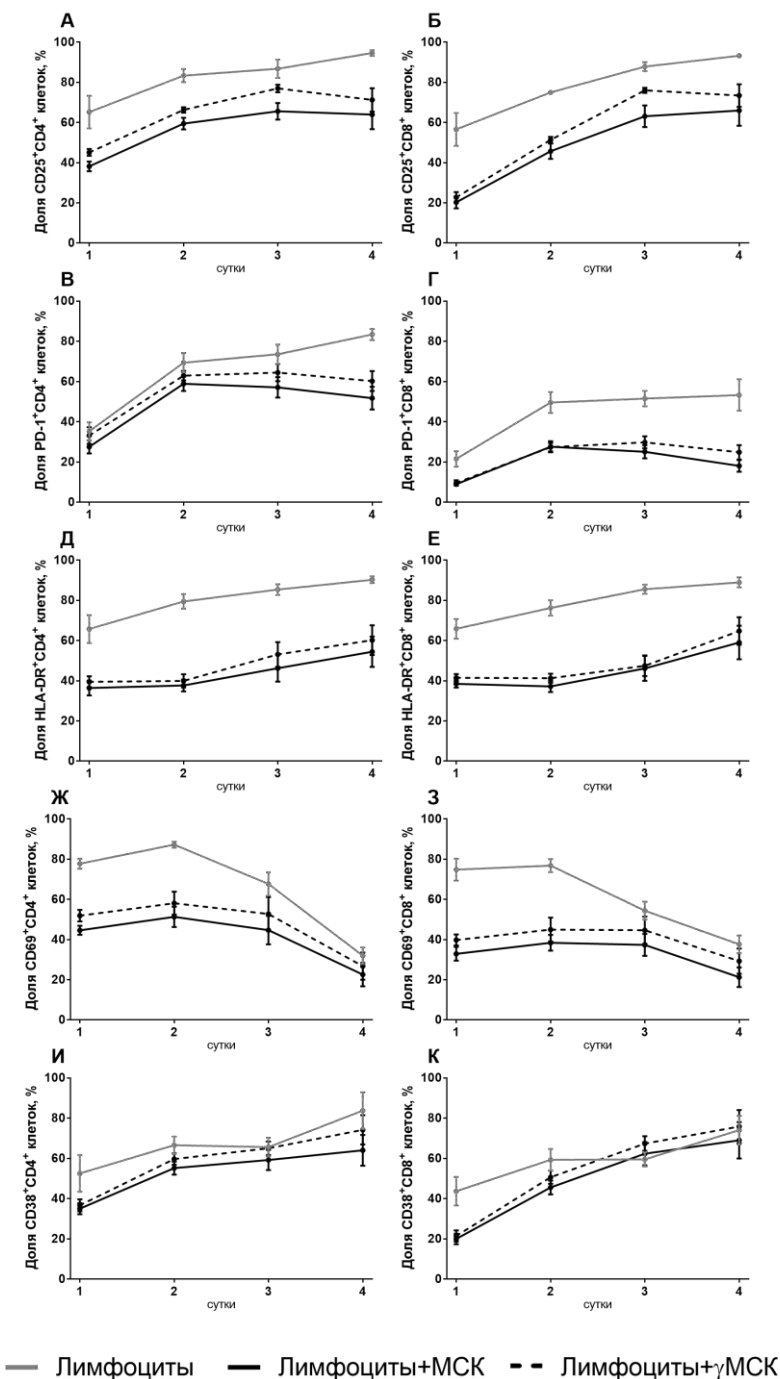


Рисунок 2 - Доля ФГА-лимфоцитов, экспрессирующих CD25, PD-1, HLA-DR, CD69, CD38, после культивирования с МСК, γ-МСК и без МСК.

А – $CD4^+CD25^+$ лимфоциты, Б – $CD8^+CD25^+$ лимфоциты, В – $CD4^+PD-1^+$ лимфоциты, Г – $CD8^+PD-1^+$ лимфоциты, Д – $CD4^+HLA-DR^+$ лимфоциты, Е – $CD8^+HLA-DR^+$ лимфоциты, Ж – $CD4^+CD69^+$ лимфоциты, З – $CD8^+CD69^+$ лимфоциты, И – $CD4^+CD38^+$ лимфоциты, К – $CD8^+CD38^+$ лимфоциты.

Относительное количество ФГА-лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR, по мере культивирования без МСК возрастало к четвёртым суткам: для CD4⁺ с $65,8 \pm 3,0\%$ до $90,3 \pm 1,6\%$ ($p = 0,007$), для CD8⁺ с $65,9 \pm 4,9\%$ до $89,0 \pm 2,5\%$ ($p < 0,0001$). При сокультивировании ФГА-лимфоцитов с МСК пропорция HLA-DR⁺ клеток была существенно ниже как для CD4⁺, так и для CD8⁺ лимфоцитов (40% на 1-ые сутки и 50-60% на 4-ые сутки) (Рисунок. 2Д, Е). Это также подтверждает наличие у МСК ингибиторных свойств по отношению к активации лимфоцитов.

Маркер ранней активации и пролиферации CD69 высоко экспрессирован на активированных CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитах. В культуре лимфоцитов доля CD69⁺ (как CD4⁺, так и CD8⁺) клеток на 1-2 сутки составляла 70-80%, а затем снижалась к 3-им суткам до 40-50% ($p = 0,045$), а к 4-ым до 25-30% ($p < 0,0001$). МСК активно ингибируют раннюю активацию и экспрессию CD69⁺ на лимфоцитах: на 1-е и 2-е сутки их количество было снижено до 30-50% ($p < 0,0001$) (Рисунок 2 Ж, З).

Доля CD38⁺ клеток в культуре ФГА-лимфоцитов достоверно возрастала на протяжении культивирования без МСК: с $52,5 \pm 9,1\%$ до $83,8 \pm 9,1\%$ ($p = 0,0005$) для CD4⁺ клеток с $43,7 \pm 7,1\%$ до $74,0 \pm 7,1\%$ ($p = 0,0001$) на 4-е сутки среди CD8⁺ клеток (Рисунок 2 И, К). Количество CD4⁺CD38⁺ и CD8⁺CD38⁺ в культурах ФГА-лимфоцитов, культивированных без МСК или в присутствии МСК, не отличалось.

Взаимодействие с МСК препятствует дифференцировке Т-клеток в культурах неактивированных лимфоцитов и снижает количество ФГА активированных Т-лимфоцитов. Полученные данные демонстрируют возможность использования МСК не только для лечения, но и для профилактики иммунологических осложнений, связанных с пролиферацией Т-клеток.

Влияние обработки интерфероном гамма на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

При анализе экспрессии CD90 на МСК и γ -МСК не были обнаружены отличия в характере изменений экспрессии данного маркера на МСК и γ -МСК как при культивировании без лимфоцитов, так и в присутствии неактивированных и ФГА-лимфоцитов (Рисунок 3 А, В, Д). При культивировании γ -МСК экспрессия CD90 не изменялась в течение 4-х суток ($p = 0,59$). Также не было обнаружено отличий между экспрессией CD90 на МСК и γ -МСК в соответствующие дни культивирования (Рисунок 3.18А).

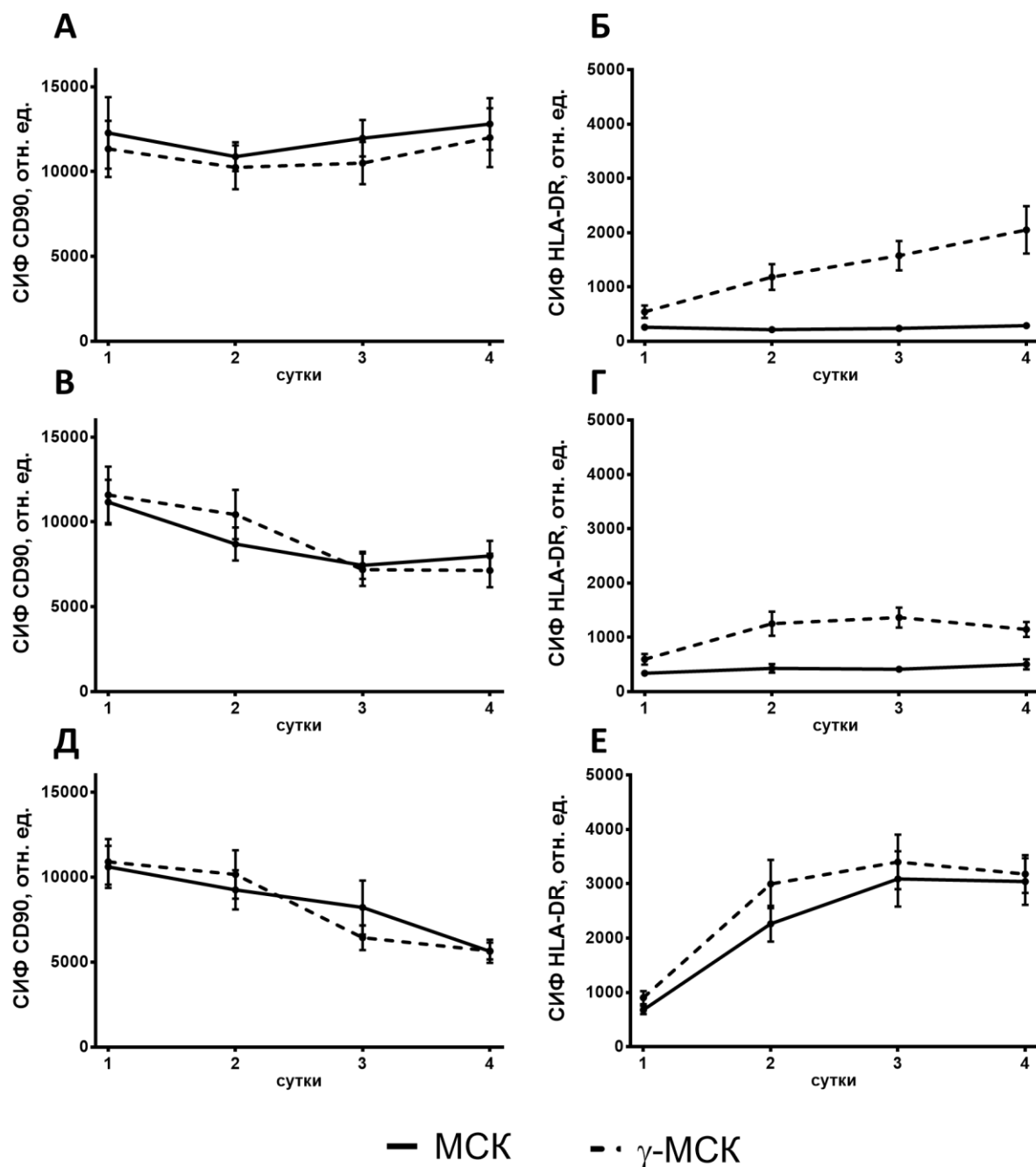


Рисунок 3 – СИФ CD90 и HLA-DR на МСК и γ -МСК

А – СИФ CD90 на МСК и γ -МСК, культивированных без лимфоцитов, Б – СИФ HLA-DR на МСК и γ -МСК, культивированных без лимфоцитов, В - СИФ CD90 на МСК и γ -МСК, культивированных с неактивированными лимфоцитами, Г - СИФ HLA-DR на МСК и γ -МСК, культивированных с неактивированными лимфоцитами, Д - СИФ CD90 на МСК и γ -МСК, культивированных с ФГА- лимфоцитами, Е - СИФ HLA-DR на МСК и γ -МСК, культивированных с ФГА- лимфоцитами

При сокультивировании γ -МСК с неактивированными лимфоцитами экспрессия CD90 снижается через 3 суток в 1,6 раз ($p = 0,026$) и в 1,6 раз через 4 суток ($p = 0,01$). Отличий между СИФ CD90 на МСК и γ -МСК обнаружено не было (Рисунок 3 В). При сокультивировании γ -МСК с ФГА-лимфоцитами экспрессия CD90 также снижается: через 3 суток в 1,6 раз ($p =$

0,009) и в 1,8 раз через 4 суток ($p = 0,0005$). Отличий между СИФ CD90 на МСК и γ -МСК обнаружено не было (Рисунок 3.18 Д).

Исследование СИФ HLA-DR на поверхности γ -МСК показало, что обработка ИФН- γ приводит к значительному увеличению экспрессии HLA-DR на поверхности МСК (Рисунок 3 Б). Уже через сутки культивирования СИФ HLA-DR на поверхности γ -МСК превышала СИФ в контрольных образцах в 2,1 раз ($p < 0,0001$). На более отдалённых сроках культивирования экспрессия HLA-DR на поверхности γ -МСК превышала экспрессию в контрольных образцах в 5,6 раз, 6,6 и 7,1 раз ($p < 0,0001$), через 2, 3 и 4 суток, соответственно. При сокультивировании с неактивированными лимфоцитами на поверхности γ -МСК также значительно увеличивается экспрессия HLA-DR. Через сутки она превышает экспрессию HLA-DR на необработанных МСК, сокультивированных с неактивированными лимфоцитами, в 1,8 раз ($p = 0,002$), через 2 суток – в 2,9 раза ($p = 0,002$), в 3,3 и 2,3 раза после 3 и 4 суток сокультивирования ($p = 0,002$) (Рисунок 3 Г).

Исследование экспрессии HLA-DR на поверхности γ -МСК, сокультивированных с ФГА-лимфоцитами, не выявило достоверных отличий от контрольной культуры МСК, культивированной в аналогичных условиях (Рисунок 3 Е).

Очевидно, что при взаимодействии МСК с интерфероном гамма клетки теряют иммунную привилегированность и становятся иммуногенными. При введении МСК пациентам в качестве терапии, эти клетки активируются за счет выделяемого лимфоцитами интерферона гамма и начинают экспрессировать HLA-DR, что может привести к их быстрой элиминации или вызвать аллореактивный иммунный ответ.

Изменение субпопуляций лимфоцитов после взаимодействия с γ -МСК

При сокультивировании лимфоцитов с γ -МСК доля наивных CD4⁺ и CD8⁺ клеток достоверно не изменяется и к четвёртым суткам превышает показатели контрольной культуры в 1,4 раза для CD4⁺ клеток ($49,6 \pm 2,3\%$ против $36,2 \pm 1,5\%$, $p = 0,0047$) и в 1,2 раза для CD8⁺ клеток ($p = 0,125$). Отличий в эффекте, оказываемом γ -МСК и МСК, не было обнаружено на всех сроках сокультивирования как для CD4⁺ ($p > 0,4$), так и для CD8⁺ Т-лимфоцитов ($p > 0,3$).

Доля эффекторных клеток памяти при сокультивировании с γ -МСК была достоверно ниже, чем в контрольных образцах: в 1,6 раз для CD4⁺ клеток ($18,65 \pm 1,09\%$ против $29,84 \pm 1,58\%$, $p = 0,0003$) и в 1,5 раз для CD8⁺ клеток ($9,56 \pm 0,55\%$ против $14,40 \pm 1,41\%$, $p = 0,0003$) после 4-х суток сокультивирования. Отличий между пропорциями наивных клеток

при сокультивировании с γ -МСК и МСК не было обнаружено на протяжении 4-х суток для эффекторных $CD4^+$ ($p > 0,5$) и $CD8^+$ ($p > 0,4$) клеток памяти.

При сокультивировании с γ -МСК лимфоциты взаимодействуют с аллогенными клетками. Обнаруженный эффект, связанный с увеличением доли Т-лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR на своей поверхности, сохраняется и при сокультивировании лимфоцитов с γ -МСК. Доля лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR, возрастает на протяжении 4-х суток: с $5,2 \pm 0,6\%$ до $15,3 \pm 2,4\%$ для $CD4^+$ клеток ($p < 0,0001$) и с $8,5 \pm 0,7\%$ до $26,2 \pm 4,5\%$ для $CD8^+$ клеток ($p < 0,0001$). Достоверных отличий между эффектом, оказываемым МСК и γ -МСК на экспрессию HLA-DR на поверхности Т-клеток, не было обнаружено на всех сроках сокультивирования.

Обработанные ИФН- γ МСК оказывают влияние на количество регуляторных Т-клеток. Сокультивирование с γ -МСК приводит к достоверному снижению их доли через 4 суток сокультивирования. В контрольных образцах лимфоцитов, культивированных без МСК, доля регуляторных Т-клеток через 4 суток составила $5,4 \pm 0,4\%$, а в образцах, сокультивированных с γ -МСК - $4,2 \pm 0,3\%$ ($p = 0,0285$). Обнаружены отличия между воздействием на лимфоциты МСК и γ -МСК: после 4-х суток сокультивирования с γ -МСК доля регуляторных клеток была достоверно ниже ($p = 0,0479$).

После активации с помощью ФГА субпопуляционный состав лимфоцитов значительно изменяется. Воздействие, оказываемое γ -МСК на субпопуляции лимфоцитов, сопоставимо с необработанными МСК.

Доля наивных $CD4^+$ клеток после сокультивирования с γ -МСК была достоверно выше, чем в контрольных лимфоцитах лишь на 4-е сутки ($9,7 \pm 2,5\%$ против $7,7 \pm 6,3\%$, $p = 0,03$). Количество наивных $CD4^+$ клеток было достоверно выше после сокультивирования с МСК по сравнению с γ -МСК ($32,1 \pm 1,6\%$, $12,8 \pm 2,3\%$, $17,5 \pm 4,5\%$ против $26,5 \pm 2,0\%$, $5,9 \pm 0,8\%$, $9,7 \pm 2,5\%$, $p = 0,0062$, $p = 0,0034$ и $p = 0,0024$ через 1, 3-е и 4-ро суток сокультивирования, соответственно). Доля наивных $CD8^+$ клеток после сокультивирования с γ -МСК превышала показатели контрольных культур через 2 и 3 суток сокультивирования ($8,3 \pm 1,7\%$ против $2,3 \pm 0,4\%$, $p = 0,0097$ и $5,9 \pm 0,8\%$ против $2,6 \pm 1,0\%$, $p = 0,04$, соответственно).

При сокультивировании с γ -МСК количество $CD8^+$ наивных клеток было достоверно ниже, чем в культурах с МСК, через сутки ($20,7 \pm 3,5\%$ против $24,0 \pm 3,2\%$, $p = 0,0159$) и четверо суток ($5,6 \pm 2,3\%$ против $10,6 \pm 3,2\%$, $p = 0,0005$).

Достоверных отличий между воздействием МСК и γ -МСК на количество $CD4^+$ SCM клеток не было обнаружено. После взаимодействия с γ -МСК доля $CD8^+$ SCM клеток была достоверно ниже, чем в контрольной культуре через сутки ($5,3 \pm 0,8\%$ против $14,4 \pm 2,8\%$, $p = 0,0009$) и 2 суток ($14,4 \pm 1,3\%$ против $22,7 \pm 2,0\%$, $p = 0,0027$) сокультивирования. Процент

CD8⁺ SCM клеток был достоверно выше после сокультивирования с γ -МСК по сравнению с МСК через 3 суток сокультивирования ($12,1 \pm 1,2\%$ против $14,8 \pm 1,6\%$, $p = 0,0009$).

Взаимодействие с γ -МСК приводит к уменьшению доли CD8⁺ SCM клеток по сравнению с контрольными ФГА-лимфоцитами через двое ($16,9 \pm 2,2\%$ против $40,9 \pm 3,4\%$, $p < 0,0001$), трое ($25,9 \pm 3,3\%$ против $51,3 \pm 3,2\%$, $p = 0,0002$) и четверо суток ($25,8 \pm 3,6\%$ против $60,2 \pm 6,2\%$, $p = 0,0013$) сокультивирования. Достоверных отличий в воздействии необработанных МСК и γ -МСК на пропорцию CD4⁺ и CD8⁺ SCM клеток не было обнаружено.

Количество CD4⁺ EM клеток снижалось ко вторым суткам культивирования как без МСК, так и с МСК, и с γ -МСК. Затем происходило увеличение доли этих клеток, и максимальное их количество обнаруживалось после 4-х суток сокультивирования. Взаимодействие с γ -МСК приводило к достоверному увеличению пропорции CD4⁺ EM клеток через 2 ($8,1 \pm 0,8\%$ против $4,6 \pm 0,9\%$, $p = 0,02$) и 3 суток ($10,6 \pm 1,8\%$ против $4,5 \pm 0,7\%$, $p = 0,03$) сокультивирования по сравнению с контрольными ФГА-лимфоцитами.

В контрольной культуре происходило уменьшение доли CD8⁺ EM клеток, тогда как сокультивирование с γ -МСК приводило к увеличению их доли. Достоверные отличия в количестве CD8⁺ EM клеток между культурами ФГА-лимфоцитов, сокультивированных с γ -МСК, и контрольными культурами определялись через сутки ($7,5 \pm 0,6\%$ против $10,2 \pm 0,8\%$, $p = 0,0134$), 3 ($14,8 \pm 1,8\%$ против $6,7 \pm 1,6\%$, $p = 0,009$) и 4 суток ($16,7 \pm 2,5\%$ против $6,8 \pm 1,1\%$, $p = 0,0139$) культивирования. Достоверных отличий в воздействии МСК и γ -МСК на пропорцию CD4⁺ и CD8⁺ EM клеток не было обнаружено.

Взаимодействие с обработанными ИФН- γ МСК приводит к снижению количества активированных лимфоцитов. Доля CD4⁺CD25⁺ ФГА-лимфоцитов, сокультивированных с γ -МСК, уже через сутки была ниже, чем в контрольной культуре ($45,1 \pm 1,7\%$ против $65,2 \pm 8,1\%$, $p = 0,0044$). На более отдалённых сроках сокультивирования взаимодействие с γ -МСК приводило к снижению пропорции CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов ($p < 0,03$). Были обнаружены достоверные отличия между ФГА-лимфоцитами, сокультивированными с МСК и γ -МСК: через сутки и трое суток сокультивирования процент активированных CD4⁺CD25⁺ клеток в культурах был достоверно выше после взаимодействия ФГА-лимфоцитов с γ -МСК ($p < 0,03$) (Рисунок 2 А). Количество CD8⁺CD25⁺ лимфоцитов после взаимодействия с γ -МСК было достоверно ниже, чем в контрольной культуре ФГА-лимфоцитов на всём протяжении сокультивирования ($p < 0,008$). Доля CD8⁺CD25⁺ клеток последовательно увеличивалась в процессе культивирования (с $22,8 \pm 2,6\%$ до $73,4 \pm 5,6\%$, $p < 0,0001$). Отличия между эффектом, оказываемым МСК и γ -МСК, были обнаружены лишь на третьи сутки сокультивирования, когда доля CD8⁺CD25⁺ лимфоцитов, сокультивированных с

γ -МСК, превысила количество соответствующих клеток в культуре с МСК в 1,2 раза ($p = 0,0161$) (Рисунок 2 Б).

Изменение доли $CD4^+PD-1^+$ клеток носит иной характер: сначала, в течение двух суток культивирования как без МСК, так и с γ -МСК, происходило достоверное увеличение их количества (в 2 раза, $p < 0,0006$), после этого в контрольной культуре происходило дальнейшее увеличение количества $CD4^+PD-1^+$ клеток до $83,3 \pm 2,8\%$ ($p = 0,028$), тогда как в культурах лимфоцитов и γ -МСК доля этих клеток достоверно не изменялась. Пропорция $CD4^+PD-1^+$ клеток была достоверно ниже при сокультивировании ФГА-лимфоцитов с γ -МСК по сравнению с контрольными культурами только после 4-х суток сокультивирования ($p = 0,0062$). Процент $CD4^+PD-1^+$ клеток при сокультивировании с γ -МСК был достоверно выше в 1,1-1,2 раза на всем протяжении сокультивирования ($p < 0,03$), за исключением вторых суток ($p = 0,0958$) (Рисунок 2 В). Доля $CD8^+PD-1^+$ клеток была достоверно ниже, чем $CD4^+PD-1^+$ клеток на всех сроках и при всех условиях культивирования ($p < 0,01$). При взаимодействии ФГА-лимфоцитов с γ МСК количество $CD8^+PD-1^+$ клеток было ниже по сравнению с контрольными ФГА лимфоцитами на всём протяжении сокультивирования (в 1,7-2,2 раз, $p < 0,002$). При сокультивировании лимфоцитов с МСК процент $CD8^+PD-1^+$ клеток был достоверно ниже, чем в культурах с γ -МСК через 3 суток культивирования ($p = 0,047$) (Рисунок 2 Г).

При сокультивировании с γ -МСК количество $CD4^+HLA-DR^+$ клеток было значимо ниже, чем в контрольной культуре на всех сроках сокультивирования ($p < 0,0125$). В присутствии γ -МСК также происходит достоверное последовательное нарастание доли $CD4^+HLA-DR^+$ лимфоцитов (с $39,5 \pm 2,8\%$ через сутки до $60,2 \pm 7,4\%$ через 4 суток сокультивирования, $p = 0,0065$), как и в контрольной культуре и при сокультивировании с необработанными МСК. Средние значения пропорции $CD4^+HLA-DR^+$ лимфоцитов при сокультивировании с γ -МСК были выше, чем в культурах с МСК, однако достоверные отличия были обнаружены лишь после трёх суток сокультивирования ($53,1 \pm 6,1\%$ против $46,2 \pm 6,6\%$, $p = 0,016$) (Рисунок 2 Д). При сокультивировании с γ -МСК доля $CD8^+HLA-DR^+$ клеток была значимо ниже, чем в контрольной культуре на всём протяжении инкубации ($p < 0,028$). Количество $CD8^+HLA-DR^+$ ФГА-лимфоцитов, сокультивированных с γ -МСК, достоверно увеличивается к 4-м суткам ($p = 0,007$). Как и в случае доли $CD4^+HLA-DR^+$ клеток, при сокультивировании с γ -МСК средние значения количества $CD8^+HLA-DR^+$ клеток были выше, чем при культивировании ФГА лимфоцитов с МСК, но достоверные отличия были обнаружены через сутки и 4 суток сокультивирования ($p = 0,0157$ и $p = 0,0359$, соответственно) (Рисунок 2 Е).

Доля $CD4^+CD69^+$ достигала максимума ко вторым суткам во всех условиях культивирования, а потом последовательно снижалась. При сокультивировании с γ -МСК процент $CD4^+CD69^+$ клеток был достоверно ниже, чем в контрольной культуре через сутки и двое суток сокультивирования ($p < 0,003$). К 4-м суткам сокультивирования с γ МСК количество этих клеток достоверно снизилось в 1,9 раз ($p = 0,02$) и не отличалось от контрольной культуры. Доля $CD4^+CD69^+$ клеток при сокультивировании с МСК была достоверно ниже, чем при сокультивировании с γ -МСК в течение первых трёх суток сокультивирования ($p < 0,04$) (Рисунок 2 Ж). Доля $CD8^+CD69^+$ клеток при сокультивировании с γ -МСК была достоверно ниже, чем в контрольных культурах на протяжении первых двух суток культивирования ($p < 0,0023$), и не изменялась на протяжении 3-х суток ($p > 0,4$). К четвёртым суткам происходило снижение количества $CD8^+CD69^+$ клеток (с $44,7 \pm 6,8$ до $29,3 \pm 6,3\%$, $p = 0,007$). Среднее значение пропорции $CD8^+CD69^+$ клеток при сокультивировании с МСК было ниже, чем при сокультивировании с γ -МСК, на всем протяжении культивирования. Достоверные отличия обнаружены через сутки и трое суток ($p = 0,03$ и $p = 0,043$, соответственно) (Рисунок 2 З).

Доля $CD4^+CD38^+$ лимфоцитов при сокультивировании с γ -МСК достоверно возрастала с течением времени ($p < 0,0015$). Достоверные отличия в процентном содержании этих клеток по сравнению с контрольной культурой ФГА-лимфоцитов обнаруживались только через четверо суток сокультивирования ($74,2 \pm 7,2\%$ против $83,8 \pm 9,1\%$, $p = 0,04$). Различия в эффекте, оказываемом МСК и γ -МСК, были обнаружены также только через 4 суток культивирования: количество $CD4^+CD38^+$ клеток после сокультивирования с МСК было достоверно ниже, чем при культивировании с γ -МСК ($p = 0,012$) (Рисунок 2 И). Доля $CD8^+CD38^+$ клеток при сокультивировании ФГА-лимфоцитов с γ -МСК также достоверно возрастала к 4 суткам ($p = 0,002$). По сравнению с контрольной культурой ФГА-лимфоцитов, при культивировании с γ -МСК количество $CD8^+$ лимфоцитов, экспрессирующих CD38, было достоверно ниже после первых суток культивирования ($p = 0,069$). Достоверных отличий в эффекте, оказываемом МСК и γ -МСК на экспрессию CD38⁺ на CD8⁺ лимфоцитах, не было обнаружено (Рисунок 2 К).

Обработка МСК интерфероном гамма не влияет на их иммуносупрессорный потенциал. Это говорит о том, что эффективность применения γ -МСК в качестве иммуносупрессивной терапии *in vivo* связана с другими изменениями их свойств после обработки интерфероном γ .

Сравнение экспрессии молекул CD90 и HLA-DR на поверхности МСК, сокультивированных с лимфоцитами стороннего донора и аутологичными лимфоцитами не выявило значимых различий.

Влияние МСК на субпопуляции лимфоцитов

При сокультивировании неактивированных лимфоцитов с МСК количество Т-клеток, экспрессирующих HLA-DR⁺, через 4 суток достигало максимума. Была выявлена корреляция между долей CD4⁺ и CD8⁺ HLA-DR⁺ лимфоцитов через 4 суток сокультивирования с МСК ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,94$). Было установлено, что при сокультивировании лимфоцитов с рядом образцов МСК изменение количества HLA-DR⁺ лимфоцитов не происходит. Для проведения дальнейших исследований донорские МСК были разделены на 2 группы: группа А, при сокультивировании лимфоцитов с МСК которой происходило увеличение доли HLA-DR⁺ лимфоцитов по сравнению с контрольными лимфоцитами, и группа Б, при сокультивировании с МСК которой увеличения HLA-DR⁺ лимфоцитов не происходило. Неактивированные лимфоциты, сокультивированные с МСК групп А и Б, обозначались как лимфоциты-А и лимфоциты-Б, а ФГА-активированные лимфоциты, сокультивированные с соответствующими МСК – ФГА-лимфоциты-А и ФГА-лимфоциты-Б.

Анализ динамики изменения доли HLA-DR⁺ в культурах лимфоцитов-А и лимфоцитов-Б показал, что относительное количество CD4⁺HLA-DR⁺ клеток в контрольной культуре не изменялось на протяжении всего срока культивирования. В культурах лимфоцитов-А происходило последовательное нарастание пропорции этих клеток от $6,1 \pm 1,0\%$ через сутки сокультивирования до $20,4 \pm 1,6\%$ через 4-ро суток культивирования ($p < 0,002$). В группе лимфоцитов-Б количество CD4⁺HLA-DR⁺ клеток также нарастало с $4,8 \pm 0,3\%$ до $7,4 \pm 0,4\%$, ($p = 0,017$), однако среди лимфоцитов-А доля этих клеток была достоверно выше, чем в контрольной группе и среди лимфоцитов-Б через 4 суток культивирования ($20,4 \pm 1,7\%$ против $8,5 \pm 2,4\%$ и $7,4 \pm 0,4\%$, $p < 0,002$). Аналогичный эффект наблюдался и среди CD8⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов.

После 4-х суток сокультивирования с МСК была обнаружена линейная зависимость между долей CD4⁺HLA-DR⁺ клеток ($p = 0,0021$, $R^2 = 0,63$), в культурах ФГА лимфоцитов и неактивированных лимфоцитов, культивированных с МСК (совокупности групп А и Б). Аналогичная зависимость была выявлена и для количества CD8⁺HLA-DR⁺ клеток ($p = 0,0059$, $R^2 = 0,55$) в культурах лимфоцитов, культивированных с МСК.

Сравнение субпопуляционного состава и экспрессии маркеров активации в культурах ФГА-лимфоцитов-А и Б с контрольными образцами не было выявило отличий в пропорциях $CD4^+$ и $CD8^+$ NV и CM, а также $CD4^+$ TE клеток и $CD8^+$ SCM, TM и TE клеток. Доля $CD4^+$ TM и EM клеток в культурах ФГА-лимфоцитов-А была выше, чем в группе ФГА-лимфоцитов-Б. Для TM клеток через двое ($2,1 \pm 0,3\%$ против $1,9 \pm 0,5\%$), трое ($1,5 \pm 0,3\%$ против $0,6 \pm 0,3\%$) и четверо ($1,8 \pm 0,2\%$ против $0,3 \pm 0,1\%$) суток ($p < 0,05$), а для EM клеток через 3 суток ($11,5 \pm 1,1\%$ против $7,9 \pm 0,9\%$, $p = 0,01$). Относительное количество $CD4^+$ SCM и $CD8^+$ TE клеток в культурах ФГА-лимфоцитов-А было ниже, чем среди ФГА-лимфоцитов-Б. Для $CD4^+$ SCM клеток через 3 суток ($16,4 \pm 1,0\%$ против $30,3 \pm 2,7\%$, $p = 0,04$), для $CD8^+$ TE клеток – через 3 и 4 суток ($9,3 \pm 1,8\%$ против $17,0 \pm 3,4\%$, $6,2 \pm 0,7\%$ против $14,1 \pm 2,9\%$, $p < 0,05$).

Отличия от контрольных культур были наиболее выражены для ФГА-лимфоцитов-Б. Доля NV $CD4^+$ ($32,1 \pm 0,7\%$ против $18,4 \pm 4,6\%$, через сутки) и $CD8^+$ ($12,1 \pm 2,7\%$ против $2,3 \pm 0,4\%$, через двое суток), SCM $CD4^+$ ($30,3 \pm 2,7\%$ против $21,6 \pm 2,0\%$ через трое суток), а также $CD8^+$ TM ($9,8 \pm 1,7\%$ против $3,7 \pm 1,1\%$, через четверо суток культивирования) и TE ($30,1 \pm 3,8\%$ против $10,2 \pm 2,3\%$, через двое суток культивирования) и $CD4^+$ EM ($8,6 \pm 0,9\%$ против $4,6 \pm 0,9\%$, через двое суток культивирования) клеток была достоверно выше, чем в контрольных культурах ($p < 0,05$). Относительное количество CM клеток среди ФГА-лимфоцитов-Б было достоверно ниже, чем в контрольных культурах через 2 ($34,8 \pm 5,3\%$ против $52,9 \pm 4,8\%$ и $14,0 \pm 4,3\%$ против $40,9 \pm 3,4\%$ для $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток), 3 ($44,4 \pm 5,8\%$ против $62,0 \pm 5,0\%$ и $19,8 \pm 4,6\%$ против $51,3 \pm 3,2\%$ для $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток) и 4 ($32,7 \pm 5,5\%$ против $64,0 \pm 9,5\%$ и $15,1 \pm 6,0\%$ против $57,7 \pm 9,3\%$ для $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток) суток культивирования ($p < 0,01$). В группе ФГА-лимфоцитов-Б не наблюдается снижение доли наивных $CD4^+$ клеток к 4-м суткам ($p < 0,03$), а также рост доли $CD4^+$ и $CD8^+$ CM клеток ($p < 0,05$) в отличие от контрольных ФГА-лимфоцитов и ФГА-лимфоцитов-А.

При сокультивировании ФГА-лимфоцитов с МСК группы А доля $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD25, PD-1, HLA-DR и CD38, через 4 суток сокультивирования становится достоверно выше, чем через сутки ($p < 0,012$). Относительное количество $CD69^+$ клеток снижается к 4 суткам (с $44,5 \pm 3,2\%$ до $15,0 \pm 4,6\%$ для $CD4^+$ клеток и с $36,2 \pm 5,3\%$ до $15,2 \pm 3,4\%$ для $CD8^+$ клеток, $p < 0,05$). При сокультивировании активированных лимфоцитов с МСК группы Б не было обнаружено увеличения количества клеток, экспрессирующих маркеры активации CD25, PD-1, HLA-DR, CD38 и CD69.

Было обнаружено, что в культурах ФГА-лимфоцитов-А по сравнению с культурами ФГА-лимфоцитов-Б достоверно больше как лимфоцитов, экспрессирующих CD25 ($77,1 \pm 2,9\%$ против $45,6 \pm 13,7\%$ для $CD4^+$ клеток и $79,6 \pm 1,8\%$ против $47,0 \pm 14,8\%$ для $CD8^+$ клеток через четверо суток), PD-1 ($64,0 \pm 3,3\%$ против $34,5 \pm 7,7\%$ для $CD4^+$ клеток через

четверо суток и $32,3 \pm 2,9\%$ против $14,9 \pm 2,5\%$ для $CD8^+$ клеток через трое суток), HLA-DR ($72,1 \pm 3,6\%$ против $29,7 \pm 9,3\%$ для $CD4^+$ клеток и $76,2 \pm 4,6\%$ против $35,0 \pm 13,1\%$ для $CD8^+$ клеток через четверо суток), а также $CD8^+CD38^+$ ($86,9 \pm 1,8\%$ против $44,0 \pm 16,4\%$ через четверо суток) клеток ($p < 0,05$).

Доля $CD69^+$ клеток в культурах ФГА-лимфоцитов-Б была достоверно выше, чем в ФГА-лимфоцитах, сокультивированных с МСК группы А ($p < 0,01$), через трое суток сокультивирования ($68,0 \pm 7,3\%$ против $28,1 \pm 4,8\%$ для $CD4^+$ клеток и $52,0 \pm 7,1\%$ против $26,8 \pm 5,0\%$ для $CD8^+$ клеток).

Сравнительный анализ экспрессии HLA-DR на МСК, показал, что в группе А в процессе культивирования в присутствии неактивированных лимфоцитов СИФ HLA-DR достоверно возрастает ($p = 0,01$) и становится выше, чем в культурах МСК без лимфоцитов ($p = 0,05$) и в культурах МСК группы Б, сокультивированных с лимфоцитами ($p = 0,016$). Независимо от группы МСК при взаимодействии с ФГА-лимфоцитами происходило достоверное увеличение СИФ HLA-DR ($p < 0,001$) (Таблица 1).

Таблица 1 – СИФ HLA-DR на МСК, культивированных без лимфоцитов, с неактивированными и с ФГА-лимфоцитами

Сутки	СИФ HLA-DR					
	МСК группа А (n=14)	МСК группа Б (n=13)	МСК + лимфоциты группа А (n=14)	МСК + лимфоциты группа Б (n=13)	МСК + ФГА-лимфоциты группа А (n=14)	МСК + ФГА-лимфоциты группа Б (n=13)
1	355 ± 54	387 ± 38	403 ± 56	396 ± 29	677 ± 74	710 ± 62
4	471 ± 58	424 ± 54	675 ± 79*	432 ± 47	2058 ± 390	3406 ± 705

* указывает на достоверные отличия между МСК групп А и Б

Полученные данные свидетельствуют о том, что МСК группы А становятся более иммуногенными, чем МСК группы Б, при взаимодействии с лимфоцитами, что может приводить к их активации и повышению экспрессии HLA-DR. Большая иммуногенность может быть причиной более быстрой элиминации МСК в организме, что приводит к снижению иммунорегуляторного воздействия МСК и, как следствие, к меньшей эффективности использования этих клеток.

Выводы

1. Взаимодействие с лимфоцитами изменяет иммунофенотип МСК: снижается экспрессия CD90 и CD105, изменяются их адгезивные свойства клеток, и они становятся иммуногенными, так как повышается экспрессия HLA-ABC и начинает экспрессироваться HLA-DR. Взаимодействие с активированными лимфоцитами оказывает аналогичный, но более выраженный эффект. Экспрессия CD73, CD80, CD86, FAS-L и PD-L1 на МСК не изменяется.

2. Аллогенные и аутологичные по отношению к МСК лимфоциты влияют на них одинаковым образом.

3. При культивировании изменяется субпопуляционный состав лимфоцитов: количество наивных клеток снижается, а эффекторных клеток памяти – возрастает. Сокультивирование с МСК препятствует этим изменениям, но вызывает увеличение количества HLA-DR⁺ Т-клеток.

МСК ингибируют переход активированных лимфоцитов из наивного в эффекторное состояние и снижают экспрессию маркеров активации CD25, PD-1, HLA-DR и CD69, что объясняет механизм иммуномодулирующего действия МСК.

4. МСК, обработанные интерфероном гамма (γ -МСК), экспрессируют HLA-DR независимо от взаимодействия с лимфоцитами. Воздействие γ -МСК на неактивированные лимфоциты не отличается от воздействия МСК, за исключением снижения числа регуляторных Т-клеток. γ -МСК оказывают меньшее воздействие на активированные лимфоциты, чем МСК.

5. Изучение взаимодействия МСК с лимфоцитами показало, что МСК здоровых доноров имеют различные иммуносупрессивные свойства, по которым их можно разделить на две группы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Капранов Н.М. Влияние предобработки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток интерфероном гамма на их иммуномодулирующие свойства / Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, Н.А. Петинати, Н.И. Дризе, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – №. 10. – С. 1510-1521.
2. Петинати Н.А. Изменение свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток под действием интерферона-гамма / Н.А. Петинати, Н.М. Капранов, А.Е. Бигильдеев, М.Д. Попова, Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, Н.И. Дризе, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163. – №. 2. – С. 194-199.
3. Капранов Н.М. Сокультивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с аутологичными и аллогенными лимфоцитами / Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, Н.А. Петинати, М.В. Бакшинскойте, Н.И. Дризе, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164. – №. 10. – С. 442-448.
4. Капранов Н.М. Индивидуальные различия мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, проявляющиеся при взаимодействии с лимфоцитами / Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, Н.А. Петинати, Н.В. Сац, Н.И. Дризе, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2018. – Т. - №2. – С. 129-134.
5. Kapranov N.M. Alterations of multipotent mesenchymal stromal cells induced by interaction with allogeneic lymphocytes in vitro / N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova, I.V. Galtseva, M.V. Bakshinskayte, N.A. Petinati, N.I. Drize, L.A. Kuzmina, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko // International Journal of Stem Cell Research and Transplantarion. – 2017. – Т. 5. – №. 2. – С. 277-286.
6. Kapranov N.M. Alterations in multipotent mesenchymal stromal cells properties: in vitro model of their interactions with allogeneic lymphocytes / N. M. Kapranov, Yu.O. Davydova, N.A. Petinati, M.V. Bakshinskayte, I.V. Galtseva, N.I. Drize, L.A. Kuzmina, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko // Cell Therapy and Transplantation. – 2016. – Т. 5. – №. 3. – С. 39-41.
7. Капранов Н.М. Изучение влияния интерферона гамма и интерлейкина 1 бета на экспрессию hla-abc, hla-dr и icam-1 на мультипотентных мезенхимных стромальных клетках / Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, Н.А. Петинати, А.Е. Бигильдеев, Н.И. Дризе, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко // Гены и Клетки. – 2017. – Т. 12. - №. 3. – С.110-111.
8. Петинати Н.А. Изменения основных свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток под действием интерферона / Н.А. Петинати, А.Е. Бигильдеев, И.Н. Шипунова, М.Д. Попова, Н.И. Дризе, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т. 61. – №. S1 (1). – С. 62-62.
9. Petinati N.A. Effective and ineffective samples of mesenchymal multipotent stromal cells used for acute graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation differ in the expression level of hla-dr when co-cultured with activated lymphocytes / N.A. Petinati, N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova, A.E. Bigildeev, N.V. Sats, I.N. Shipounova, N.I. Drize, I.V. Galtseva, L.A. Kuzmina, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko // Blood – 2017.- Т. 130.- с. 5494.
10. Kapranov N.M. Interaction of multipotent mesenchymal stromal cells and lymphocytes / N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova, I.V. Galtseva, M.V. Bakshinskayte, N.A. Petinati, N.I. Drize, L.A. Kuzmina, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko // Bone marrow transplantation. – 2017. – Т. 52. – S1. – С. S171.
11. Petinati N. et al. Interaction of multipotent mesenchymal stromal cells with lymphocytes reduces their immuno privileged property / N.A. Petinati, N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova, I.V. Galtseva, M. Bakshinskayte, N.I. Drize, L.A. Kuzmina, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko // Haematologica. – 2017. – Т. 102. – №. S2. – С. 452-452.
12. Kapranov N. M. et al. Immune privileged features of multipotent mesenchymal stromal cells are lost after co-cultivation with allogeneic lymphocytes in vitro / N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova, N.A. Petinati, M.V. Bakshinskayte, I.V. Galtseva, N.I. Drize, L.A. Kuzmina, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko // Blood – 2016. - Т. 128.- № 22 – с. 5722.