

УДК 616:612.017.1

А. Е. ГОНЧАРОВ¹, Н. Г. АНТОНЕВИЧ¹, В. Л. ЧЕКАН²

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ НА АНТИГЕННЫЙ ПРОФИЛЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

¹- РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;

²- Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Целью работы явилось изучение влияния мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки (МСК ОВ) на антигенный профиль ДК. Установлено, что при контактном сокультивировании с МСК ОВ у ДК происходит дифференцировка в толерогенном направлении, выражающаяся в увеличении экспрессии маркеров CD85k и CD273, снижении на мембране количества молекул HLA-DR, CD80 и CD86. Полученные данные указывают на перспективность применения МСК ОВ в качестве биомедицинского клеточного продукта для лечения аутоиммунных заболеваний. Равным образом, МСК можно использовать для дифференцировки толерогенных ДК *in vitro*.

Ключевые слова мезенхимальные стволовые клетки, обонятельная выстилка, дендритные клетки, толерантность

Введение. Несмотря на достижения современной медицины, поиск эффективных методов терапии аутоиммунных заболеваний остается весьма востребованным. Перспективным биомедицинским клеточным продуктом могут стать МСК, получаемые из обонятельной выстилки (ОВ) человека [8, 10, 11]. МСК ОВ, как и другие типы МСК, способны оказывать иммуномодулирующее влияние на различные популяции клеток иммунной системы, что лежит в основе клеточной терапии [5]

Отмечена иммуносупрессивная активность МСК ОВ по отношению к Т- и В-лимфоцитам, натуральным киллерам [2, 13]. Тем не менее, отсутствуют работы, посвященные оценке влияния МСК ОВ на дендритные клетки (ДК). Актуальность изучения этого вопроса связана с тем, что ДК являются главным связующим и регуляторным звеном при реализации всех этапов иммунного ответа. Изучение влияния МСК ОВ на ДК позволит углубить фундаментальные знания о малоизученном типе стволовых клеток и оценить возможность их применения в лечении аутоиммунных заболеваний.

Целью данной работы явилось изучения влияния МСК ОВ на антигенный профиль ДК при сокультивировании.

Материалы и методы. *Получение культур МСК ОВ.* Образцы ткани ОВ среднего носового хода взяты из материала, направляемого на гистологическое исследование, после проведения плановых хирургических вмешательств пациентам с заболеваниями носовой полости и околоносовых пазух (Белорусская медицинская академия последипломного образования, РНПЦ оториноларингологии). Культуры МСК ОВ получали по ранее разработанной методике [1, 12]. В исследовании использовали 8 культур, восстановленных из криоконсервации, которые соответствовали паспортным данным: имели фенотип – CD90⁺CD105⁺CD73⁺/CD31⁻CD45⁻HLADR⁻, характеризовались отсутствием микробиологической контаминации.

Получение культур ДК из мононуклеаров периферической крови (МПК). Мононуклеарные клетки (МПК) выделяли из гепаринизированной венозной крови методом градиентного центрифугирования на градиенте плотности Histopaque-1077 ($\rho=1,077$ г/см³). МПК ресуспендировали в 10 мл среды RPMI-1640 с 10% FBS и помещали в 25 см² культуральные флаконы с повышенной адгезивной способностью (Sarstedt Cell+). Клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 45 минут для адгезии моноцитов. Затем удаляли среду с неприкрепившимися клетками, промывали 2 раза DPBS. Во

флаконе с моноцитами добавляли по 10 мл питательной среды, содержащей ГМ-КСФ в конечной концентрации 100 нг/мл и ИЛ-4 – 50 нг/мл. Клетки культивировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 6 суток. В исследовании использовали 8 культур ДК, полученных от различных доноров.

Схема постановки эксперимента по сокультивированию МСК ОБ и ДК. При постановке эксперимента в различных комбинациях использовали 8 культур МСК ОБ, полученные от разных доноров, и культуры ДК, полученные из МПК 8-ми доноров.

Вариант 1, отрицательный контроль (iDC): к 2 мл ДК в полной ростовой среде RPMI-1640 добавляли 2 мл свежей полной ростовой среды DMEM/F-12 (1:1).

Вариант 2, положительный контроль (LPS-DC): к 2 мл ДК в полной ростовой среде RPMI-1640 добавляли 2 мл свежей полной ростовой среды DMEM/F-12 (1:1), для индукции созревания ДК вносили липополисахарид *E. coli* (ЛПС) в конечной концентрации 1 мкг/мл.

Вариант 3, контактное сокультивирование (MSC-DC): за 2 – 3 суток до начала совместного культивирования культуры МСК ОБ высевали в 4 мл ростовой среды DMEM/F-12 (1:1) с 10% FBS (полная ростовая среда) на 6-луночные планшеты в концентрации 15 – 20 тыс. кл./см². После образования монослоя МСК ОБ с конfluентностью 70 – 80% удаляли из лунки 2 мл ростовой среды и вносили туда 2 мл суспензии ДК в полной ростовой среде RPMI-1640, (соотношение МСК и ДК 1:1 – 1:1,5).

Вариант 4, культивирование в системе Трансвел (Ins-DC): После образования монослоя МСК ОБ из лунки удаляли 2 мл ростовой среды, на лунку помещали культуральный вкладыш с диаметром пор 8 мкм и вносили в него 2 мл суспензии ДК в полной ростовой среде RPMI-1640, (соотношение МСК и МПК 1:1 – 1:1,5).

После внесения всех компонентов планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе (37 °С, 5% CO₂ и 95% влажность воздуха) в течении 3 суток, затем проводили учет результатов.

Определение иммунофенотипа. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием антител к молекулам CD32, CD80, CD85k, CD86, CD273, HLA-DR. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Biosciences, США). В процессе учета проб выделяли регион ДК по параметрам прямого и бокового светорассеяния, в котором регистрировали не менее 10 000 событий. Учитывали как содержание позитивных по исследуемому маркеру клеток (процент экспрессии), так и относительную интенсивность флуоресценции, которая отражает число молекул (в усл. ед.) на клетку. Для анализа данных использовали программу Weasel версии 3.0.2 (WENI, Австралия). Количество исследуемых молекул на поверхности клеток оценивали по показателю относительной интенсивности флуоресценции (RFI). Величину этого параметра выражали в условных единицах флуоресценции.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 10 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25-й и 75-й перцентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро–Уилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Для изучения влияния МСК на ДК оценивали уровень экспрессии на поверхности ДК различных групп молекул как иммуногенного, так и толерогенного характера. Поскольку взаимодействие ДК и Т-клеток является ключевым в развитии иммунного ответа, предпочтение было отдано молекулам, наличие которых на мембране ДК указывает на их способность модулировать функциональное состояние Т-клеток.

Известно, что активация Т-клеток определяется наличием 3 различных по своей природе сигналов: 1) взаимодействием Т-клеточного рецептора с молекулой ГКГ II класса, 2) взаимодействием костимуляторных молекул и 3) влиянием продуцируемых клетками цитокинов.

Ранее считалось, что слабое взаимодействие между вышеупомянутыми группами молекул приводит к развитию анергии или толерантности. В настоящее время, открытие огромного числа коингибиторных молекул позволило пересмотреть взгляд на природу формирования периферической толерантности, т.е. результат взаимодействия клеток: активация или анергия зависит от взаимодействия костимуляторных и коингибиторных

молекул, а, следовательно, от антигенного профиля ДК. Иммуногенные и толерогенные ДК существенно отличаются по степени экспрессии костимуляторных и коингибиторных молекул.

В последнее десятилетие открыто 4 основных семейства костимуляторных и коингибиторных молекул:

- 1) семейство В7-CD28-молекул: CD80 (В7.1) /CD86 (В7.2) и CD28/CD152 (CTLA-4), CD273 (В7-DC)/CD274 (В7-Н1) и PD-1, ICOS-L и ICOS (CD278), HVEM и CD272 (ВТLА);
- 2) молекулы SLAM-семейства, включая CD150, CD48 и CD244 (2В4);
- 3) молекулы семейства иммуноглобулинов, такие как Tim-3, CD223 (Lag-3) и молекула CD160;
- 4) молекулы суперсемейства ФНО: CD70 – CD27 [4, 6, 7, 9].

В перечень анализируемых молекул были отобраны костимуляторные молекулы CD80 и CD86, степень экспрессии которых свидетельствует о зрелости и способности ДК активировать Т-клетки в процессе иммунного ответа за счет взаимодействия со своими лигандами CD28 и CD152 (CTLA-4). К маркерам, экспрессия которых возрастает в процессе активации, можно также отнести молекулу CD32 – низкоаффинный рецептор к IgG, который участвует в NF-κВ-опосредованной передаче сигналов, модулирует функциональную активность Т-лимфоцитов на ранних стадиях дифференцировки, характерен для зрелых ДК [3].

Плотность молекул ГКГ II типа HLA-DR на цитоплазматической мембране ДК связана со способностью клеток эффективно презентировать антиген и также определяет уровень зрелости клеток.

К белкам, обеспечивающим толерогенные свойства ДК, относится коингибиторный маркер CD273 – лиганд для PD-1(CD279), который участвует в подавлении ответа активированных Т- и В-клеток и запускает в них механизмы апоптоза. Также, важную роль при развитии толерантности к определенным антигенам играет мембранный рецептор CD85k, который обеспечивает регуляцию интенсивности иммунного ответа через TNFRSF5 и NF-κВ сигнальные пути.

Таким образом, по изменению экспрессии указанных маркеров и количеству позитивных клеток в общей популяции можно судить о функциональных свойствах ДК, приобретенных в процессе сокультивирования с МСК.

Анализ иммунофенотипа ДК, культивированных с ЛПС (LPS-DC), показал усиление экспрессии молекул CD32 ($p=0,001$), CD80 ($p=0,001$), CD86 ($p=0,001$) и HLA-DR ($p=0,001$) в сравнении с незрелыми ДК (таблица).

Таблица. Иммунофенотип ДК, культивированных в разных условиях

Показатель	Условия культивирования ДК				P		
	iDC	MSC-DC	LPS-DC	Ins-DC	iDC/ DC+MSC	iDC/ LPS-DC	iDC/ Ins-DC
CD80, %	21,2(16,7-24,7)	30,8(25,4-33,0)	96,9(91,4-99,1)	20,7(17,0-22,6)	0,01	0,001	0,96
CD80, RFI	41,3(39,2-46,4)	24,6(18,8-27,6)	60,2(57,8-61,0)	43,4(37,5-46,3)	0,001	0,001	0,79
CD86, %	97,9(96,4-98,7)	98,9(96,9-99,3)	98,2(96,3-99,0)	97,4(96,8-97,9)	0,37	0,79	0,71
CD86, RFI	14,1(12,0-15,5)	6,5(6,0-7,7)	23,4(22,3-25,2)	10,5(9,3-12,4)	0,001	0,001	0,03
CD273, %	27,1(19,0-33,5)	49,6(35,6-57,3)	16,8(13,3-20,7)	28,4(26,3-31,0)	0,02	0,07	0,71
CD273, RFI	3,3(2,7-3,6)	2,8(2,3-3,3)	2,2(2,1-2,4)	3,1(2,8-3,4)	0,27	0,02	0,79
CD85k, %	36,7(29,3-47,8)	76,9(71,5-83,0)	25,7(19,6-29,2)	33,1(29,9-37,9)	0,001	0,02	0,87
CD85k, RFI	3,7(3,0-4,2)	6,1(4,1-7,8)	2,6(2,1-3,9)	3,5(2,7-3,9)	0,03	0,23	0,71
CD32, %	46,9(40,2-50,9)	80,1(71,1-93,4)	88,5(87,3-94,4)	49,0(45,1-51,5)	0,004	0,001	0,46
CD32, RFI	8,2(7,5-9,8)	17,6(16,1-21,1)	46,0(43,7-53,8)	7,7(6,6-9,8)	0,001	0,001	0,71
DR, %	98,8(95,9-99,7)	98,8(97,5-99,4)	98,8(97,5-99,6)	98,0(96,6-99,2)	0,96	0,96	0,67
DR, RFI	431,6(402,9-460,3)	330,9(306,8-358,1)	989,5(927,9-1060,5)	402,2(384,4-426,3)	0,001	0,001	0,16

В то же время, действие ЛПС проявилось в снижении интенсивности экспрессии молекулы CD273 ($p=0,02$), уменьшении содержания CD85k⁺ ДК ($p=0,02$). Таким образом, ЛПС проявил себя как классический индуктор иммуногенных свойств ДК.

Анализ фенотипа ДК после контактного сокультивирования с МСК ОВ показал снижение экспрессии маркеров иммуногенной активации. Так, выявлено снижение интенсивности экспрессии HLA-DR ДК, культивированных с МСК ($p=0,001$), при том, что практически все ДК экспрессировали данный маркер.

МСК ОВ проявили двойственность во влиянии на экспрессию костимуляторных молекул ДК. С одной стороны, установлено достоверное увеличение числа CD80-позитивных клеток, с другой – интенсивность экспрессии этой молекулы уменьшилась в 1,7 раза. Интенсивность экспрессии CD86 также уменьшилась в 2 раза после культивирования с МСК, в то время как число CD86⁺ клеток оставалось без существенных изменений.

Интересные результаты также получены в отношении ингибиторных молекул. При практически 2-кратном увеличении числа CD273⁺ ДК интенсивность экспрессии этой молекулы достоверно не изменилась. В то же время, MSC-DC характеризовались существенно возросшей экспрессией типичного маркера толерогенных ДК – CD85k.

Культивирование МСК с ДК, помещенных в культуральные вставки, достоверно не повлияло на экспрессию большинства из исследованных молекул (за исключением снижения экспрессии молекулы CD86).

Таким образом, можно утверждать, что при совместном культивировании с МСК у ДК происходит индукция толерогенного профиля, причем, только при непосредственном контакте клеток. В связи с этим можно сделать вывод о важной роли межклеточных контактов, а не секретлируемых факторов, при формировании толерогенного фенотипа у ДК. Еще ранее нами было показано, что для проявления иммуносупрессивного эффекта МСК ОВ по отношению к индуцированной пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов также необходим непосредственный контакт клеток [2].

Важно отметить, что ДК с толерогенным фенотипом, полученные в серии экспериментов, характеризовались наличием всех присущих ДК молекул, хотя интенсивность их экспрессии существенно снижалась. Из этого можно сделать вывод о «физиологичности» воздействия МСК на ДК и отсутствии существенно подавления функции клеток, что часто выявляют при получении толерогенных ДК воздействием различных химических веществ (цитостатики, глюкокортикоиды, большие дозы витамина Д и пр.).

Заключение. Показано, что МСК ОВ существенно изменяют иммунофенотип дендритных клеток, усиливая их толерогенные свойства. Так, влияние МСК ОВ на ДК проявилось в увеличении экспрессии ДК коингибиторной молекулы CD273, молекулы межклеточной адгезии ILT-3 (CD85k), снижении экспрессии молекул CD80, CD86 и HLA-DR.

Известно, что целью терапии аутоиммунных заболеваний является устранение иммунного воспаления, вызывающего повреждение собственных тканей и органов. С этой целью используют иммуносупрессирующие лекарственные средства (глюкокортикостероиды, различные цитостатики), моноклональные антитела, иммуномодулирующие лекарственные средства, биомедицинские клеточные продукты (МСК, Т-клетки).

Идеальное лечебное средство для терапии заболеваний, имеющих в основе нарушение иммунологической толерантности, должно, на наш взгляд, обладать способностью избирательно элиминировать лишь антигенспецифические лимфоциты, непосредственно участвующие в иммунном воспалении и повреждении тканей, но не затрагивать иммунитет в целом.

В настоящее время лекарственные средства, обеспечивающие элиминацию антигенспецифических клеток неизвестны. Но имеется возможность достигнуть поставленной цели, используя клеточные технологии, в частности толерогенные ДК, обладающие способностью к торможению специфического иммунного ответа, главным образом посредством индукции Т-клеточной анергии и стимуляции формирования регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Т-лимфоцитов.

Относительная простота выполнения биопсии эпителия, необходимого для получения МСК ОВ, и хорошая переносимость данной процедуры, в сравнении с забором костного мозга, делает данный тип МСК особенно привлекательным как непосредственно для клеточной терапии, так и для использования МСК в качестве индуктора толерогенных свойств у ДК.

Также, для достижения большего терапевтического эффекта возможна сочетанная котрансплантация МСК ОВ с толерогенными ДК. Это предположение требует проведения дальнейших исследований.

На наш взгляд, на основе МСК-индуцированных толерогенных ДК можно получить лечебное средство для терапии заболеваний, имеющих в основе нарушение иммунологической толерантности.

Результаты настоящего исследования воодушевляют на дальнейшую работу по исследованию функциональных свойств толерогенных ДК, выявлению их способности подавлять пролиферацию и функциональную активность антигенспецифических Т-клеток у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Литература:

- [1]. Антоневиц Н.Г. и др. // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 28. СПб: Изд-во Политехн. ун-та, 2012. С. 27 – 36;
- [2]. Антоневиц Н. Г., Гончаров А. Е., Чекал В. Л. // Здоровье. 2014. №10. С. 14 – 19;
- [3]. Banki Z. et al. // The Journal of Immunology. 2003. Vol. 170, N. 8. P.3963 – 3970;
- [4]. Cai G., Freeman G. J. // Immunol. Rev. 2009. Vol. 229, N 1. P. 244 – 258.
- [5]. Figueroa F. E. et al. // Biol. Res. 2012. Vol. 45. P. 269 – 277;
- [6]. Freeman, G. J., Sharpe A. H. // Nat. Immunol. 2012. Vol. 13, N 2. P. 113 – 115;
- [7]. Huang X., Yang Y. // Front. Microbiol. [Electronic resource]. 2011. Vol. 2. P. 202. – doi: 10.3389/fmicb.2011.00202. – Mode of access: www.journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2011.00202/full. – Date of access : 22.05.2014;
- [8]. Mackay-Sim A. // Archives Italiennes de Biologie. 2010. Vol. 148. P. 47 – 58;
- [9]. Murphy K. M., Nelson C. A., Sed J. R. // Nat. Rev. Immunol. 2006. Vol. 6, N 9. P. 671 – 681;
- [10]. Nivet N. et al. // The Journal of Clinical Investigation. 2011. Vol. 121. P. 2808 – 2820;
- [11]. Pandit S. et al. // Stem Cells. 2011. Vol. 6. P. 670 – 677;
- [12]. Roisen F. J., Klueber K. M., Lu C. L. // Brain Res., 2001. Vol. 89. P.11 – 22.
- [13]. Trapani M. et al. // Stem Cells Dev. 2013. Vol. 12. P. 2990 – 3002.

Поступила в редакцию: 13.10.2015 г.

A. Ye. HANCHAROU¹, N. H. ANTONEVICH¹, V. L. CHEKAN²

THE INFLUENCE OF OLFACTORY MUCOSA-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE ANTIGENIC PROFILE OF THE DENDRITIC CELLS

¹ - Centre of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;

² - The Belarusian State Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Blarus

Summary

The aim of the current study was to evaluate the effects of olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells (hOM-MSCs) on the antigenic profile of dendritic cells (DC). It was found that only the direct cell contact led to DC differentiation towards the tolerogenic profile. Increased expression of CD85k and CD273 and reduced expression of HLA-DR, CD80 and CD86 was shown. These results suggest that hOM-MSCs are a promising biomedical cell product for the treatment of autoimmune diseases and the tool for the differentiation of tolerogenic DC in vitro.

Key words: mesenchymal stem cells, olfactory mucosa, dendritic cells, tolerance.