

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕ-
ЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА»

Факультет фундаментальной медицины

На правах рукописи

Горюнов Кирилл Владимирович

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕЗЕН-
ХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА Т-ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА**

03. 03. 04-клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
Рубцов Ю. П.

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	12
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1. Мезенхимные стромальные клетки: открытие, характеристика, фенотип и функции	18
2. Иммунорегуляторная активность МСК	20
2.1 Воспаление и хроническое воспаление при регенерации тканей	20
2.2 Молекулярная иммунорегуляторная программа МСК	24
4. Иммуносупрессорное действие МСК на клетки иммунитета	25
4.1 Участие лимфоцитов в хроническом воспалительном процессе	25
4.2 МСК влияют на дифференцировку различных популяций Т-клеток	26
4.2.1 CD4 Т-клетки: разнообразие, созревание и функции	26
4.2.2 МСК влияют на дифференцировку Th1 и Th2 лимфоцитов.....	27
4.2.3 МСК участвуют в регуляции дифференцировки Th17 и Treg лимфоцитов.....	28
4.2.4 МСК способны управлять дифференцировкой цитотоксических Т-лимфоцитов.....	29
4.3 МСК снижают активность Т-лимфоцитов <i>in vitro</i>	30
4.4 Молекулярные механизмы иммуносупрессорного влияния МСК на Т-лимфоциты	31
4.4.1 IDO – основной фактор иммуносупрессорной программы МСК человека	32
4.4.2 Роль NO в иммуносупрессорном действии мышиных МСК на Т-клетки.....	35
4.4.3 Роль дополнительных растворимых факторов в бесконтактной иммуносупрессии МСК	38
4.4.4 Везикулярный транспорт МСК как механизм кооперативного действия растворимых иммуносупрессорных факторов	41
4.4.5 МСК блокируют активность Т-клеток при аутоиммунных заболеваниях	42
4.4 Контактные взаимодействия между МСК и Т-лимфоцитами.....	45
4.4.1 Участие молекул адгезии в хоуминге МСК.....	45
4.4.2 Участие контактных механизмов в иммуносупрессии лимфоцитов с помощью МСК.....	46
4.5 МСК подавляют функции В-клеток.....	49
4.6 Влияние МСК на клетки врожденного иммунитета.	50
5. МСК участвуют в поддержании нормального функционирования иммунных клеток	53
5.1 МСК модулируют активность дендритных клеток.....	54
5.2 МСК обеспечивают выживание наивных и активацию стимулированных в субоптимальных условиях Т-клеток	55
5.3 МСК регулируют баланс между фенотипами макрофагов в зависимости от условий микросреды и способствуют активации нейтрофилов.....	56
5.4 МСК и презентация антигена	56
Резюме.....	57

6. Клинические исследования МСК	58
Заключение обзора литературы	59
МАТЕРИАЛЫ	60
Доноры МСК и лимфоцитов	61
МЕТОДЫ	61
Выделение и культивирование МСК жировой ткани человека	61
Пассирование МСК	62
Выделение лимфоцитов периферической крови	62
Совместная инкубация МСК и лимфоцитов	63
Сбор МСК и лимфоцитов для анализа	63
Оценка пролиферации ЛПК	64
Окрашивание клеток антителами и анализ с помощью проточной цитофлуориметрии	65
Оценка апоптоза лимфоцитов	65
Получение прижизненных изображений клеток	66
Выделение мРНК из клеточных лизатов	66
Получение кДНК методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени	66
Электрофорез белков в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг	68
Ингибиторный анализ	69
Обработка данных	71
РЕЗУЛЬТАТЫ	72
1. Изучение иммуносупрессорных свойств МСК	72
1.1 Разработка системы и подбор условий для изучения иммуносупрессорных свойств МСК.....	72
1.1.1 МСК снижают пролиферацию активированных лимфоцитов	74
1.1.2 Инкубация с МСК не приводит к увеличению спонтанного апоптоза активированных лимфоцитов.....	76
1.1.3 Негативный эффект МСК на пролиферацию активированных лимфоцитов сопровождается снижением на их поверхности уровня α -субъединицы рецептора IL-2 (CD25).....	77
1.2 Супрессия лимфоцитов под действием МСК зависит от растворимых факторов	79
1.2.1 В бесконтактном механизме иммуносупрессии МСК участвует IDO.....	79
1.2.2 Ингибирование ферментативной активности IDO значительно снижает иммуносупрессорное действие МСК.....	82
1.2.3 Анализ участия iNOS и его продукта NO в иммуносупрессорной программе МСК человека	84
2. Изучение роли контактных взаимодействий в иммунорегулирующей программе МСК	86
2.1 Контактная инкубация приводит к увеличению мРНК и уровня белка ICAM-1 в МСК.....	86
2.2 МСК регулируют активность лимфоцитов, изменяя уровень ICAM-1 на их поверхности.....	88

2.3 Уровень мРНК ICAM1 в МСК и лимфоцитах возрастает под действием супернатанта после совместной инкубации МСК и Т-клеток	91
2.4 ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов необходим для реализации контактной иммуносупрессии	91
2.5 Блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов не влияет на бесконтактную иммуносупрессию, реализуемую через IDO	94
3. Изучение свойств МСК, поддерживающих выживание Т-клеток.....	95
3.1 Поддержка лимфоцитов за счет МСК зависит от соотношения клеток	95
3.2 Поддержка лимфоцитов за счет МСК максимальна в контактных условиях и коррелирует с увеличением уровня CD25 на интактных CD4 Т-клетках.....	96
3.3 ICAM-1 на поверхности МСК участвует в поддержке выживания лимфоцитов	98
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
ВЫВОДЫ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АПК – антигенпрезентирующая клетка

АЗА – 5-азацитидин

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВВ – внеклеточные везикулы

ГПК – гематопоэтические прогениторные клетки

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ДК – дендритные клетки

EP2, EP4 – рецепторы простагландина E2

ЛПК - лейкоциты периферической крови

ЛФ - лимфоциты

мРНК – матричная РНК

М – среднее значение

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСК – мезенхимные стромальные клетки

МФ – макрофаги

М1 – провоспалительные макрофаги

М2 – противовоспалительные макрофаги

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

НФ – нейтрофилы

НЛ – нейтрофильные ловушки

НФК - N-формилкинуренин

НК – натуральные киллеры

ОВА - овальбумин

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПК – плазматические клетки

РА – ревматоидный артрит

РК – ретиноевая кислота

РС – рассеянный склероз

РНК – рибонуклеиновая кислота

СКВ – системная красная волчанка

тРНК – транспортная РНК

ТКР - Т-клеточный рецептор

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФГА - фитогемагглютинин

ЦНС – центральная нервная система

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЭАЭ - экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

1-МТ -1-метил-D-триптофан

ЗТЗ –эмбриональные фибробласты мыши

Akt - protein kinase B, протеинкиназа B

АМПК - AMP activated protein kinase, АМР-активируемая протеинкиназа

B220 – CD45 isoform, изоформа CD45

Bregs – regulatory B-cells, регуляторные В-клетки

B7-H4 – V-set domain containing T-cell activation inhibitor 1, ингибитор активации Т-клеток 1, содержащий вариабельный иммуноглобулиноподобный домен

BDNF - brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга

c-Rel - member of the NF-κB family, член семейства NF-κB

CMV – cytomegalovirus, цитомегаловирус

C1866 - human T cell leukaemia line, линия лейкемических Т-лимфоцитов человека

CCL22, 5, 17 - C-C motif chemokine ligand, C-C хемокин лиганд 22, 5, 17

CCRs - рецепторы C-C хемокинов

CD1d - MHC class I antigen-like glycoprotein, подобный МНС-I гликопротеин

CD3 – cluster of differentiation 3, мультипротеиновый комплекс на поверхности Т-лимфоцитов, являющийся основным корецептором Т-клеточного рецептора

CD4 – cluster of differentiation 4, мономерный трансмембранный гликопротеин надсемейства Ig

CD5 - receptor expressed on the surface of T cells, рецептор Т-клеток

CD8 – cluster of differentiation 8, трансмембранный гликопротеин, служащий корецептором Т-клеточных рецепторов

CD11 – α unit of integrins, α субъединица интегринов

CD13- alanyl aminopeptidase, аланинаминопептидаза

CD19 - B-lymphocyte antigen, антиген В-лимфоцитов

- CD25** – interleukin-2 receptor alpha chain, α субъединица рецептора интерлейкина 2
- CD28** – cluster of differentiation 28, мембранный белок костимуляции Т-лимфоцитов
- CD40** – tumor necrosis factor receptor superfamily member 5, -рецептор семейства факторов некроза опухоли 5 типа
- CD40L** – CD40 ligand, лиганд CD40
- CD44**- homing cell adhesion molecule, молекула клеточной адгезии при хоуминге
- CD45RO** - protein tyrosine phosphatase, receptor type, C, тирозин-фосфатазный рецептор типа C активированных и Т-клеток памяти
- CD46** – cluster of differentiation 46, мембранный кофакторный белок
- CD55** – cluster of differentiation 55, фактор ускорения распада компонента
- CD59** - cluster of differentiation 59, ингибитор мембраноатакующего комплекса
- CD69** – cluster of differentiation 69, лектин С типа
- CD73** – ecto-5'-nucleotidase, экто-5`-нуклеотидаза
- CD80** – cluster of differentiation 80, молекула антигенпрезентирующих клеток для активации Т-лимфоцитов
- CD86** – cluster of differentiation 86, молекула примирования Т-лимфоцитов
- CD90** – cluster of differentiation 90, N-гликозилированный заякоренный белок с варибельным иммуноглобулиноподобным доменом
- CD 105** – endoglin, эндоглин
- CD127** - IL-7 receptor, рецептор IL-7
- CD206** - the mannose receptor, рецептор маннозы
- c-kit** - mast/stem cell growth factor receptor, рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток
- COX2** – cyclooxygenase 2, циклооксигеназа-2
- SDF-1** - stromal cell-derived factor-1, стромальный фактор 1, полученный из клетки
- CXCL2** –macrophage inflammatory protein 2-alpha, воспалительный белок макрофагов 2 α
- CXCR4** - C-X-C chemokine receptor type 4, C-X-C рецептор хемокина 4
- CXCRs** - CXC chemokine receptors, рецепторы C-X-C хемокинов
- DETA-NO** - диэтилентриамин-NO
- ECM** - extracellular matrix, внеклеточный матрикс
- EGF** – epithelial growth factor, эпителиальный фактор роста

eIF-2a - eukaryotic translation initiation factor 2, эукариотический фактор инициации трансляции 2a

ERKs - extracellular signal-regulated kinases, киназы, регулируемые внеклеточными сигналами

Fas - apoptosis antigen 1 – антиген апоптоза 1

FasL – Fas ligand, лиганд Fas

bFGF - basic fibroblast growth factor, основной фактор роста фибробластов

Foxp3 - forkhead box P3, белок семейства Forkhead 3

GCN2 – serine/threonine-protein kinase, киназа-сенсор свободных аминокислот

GM-CSF - granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов

GTP - guanosine-5'-triphosphate, гуанозин-5`-трифосфат

GDP - guanosine-5'-diphosphate, гуанозин-5`-дифосфат

GR – glucocorticoid receptor, глюкокортикоидный рецептор

GvHD - graft-versus-host disease, реакция трансплантата против хозяина

HeLa - Henrietta Lacks`s cervical cancer cell line, линия раковых клеток эндотелия матки, названная в честь пациентки Генриетты Лакс

HGF – hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов

HLA-DR – MHC class II, главный комплекс гистосовместимости II типа

HLA-G - human leukocyte antigen G, человеческий лейкоцитарный антиген 1 типа G

HO-1 - heme oxygenase-1, гемоксигеназа 1

ICAM-1- intercellular adhesion molecule 1 – молекула межклеточной адгезии 1

IDO - indoleamine 2,3-dioxygenase, индоламин-2,3-диоксигеназа

IFN- γ – interferon gamma, интерферон γ

Ig – immunoglobulin, иммуноглобулин

IL- interleukin– интерлейкин

iNOS - inducible nitric oxide synthase, индуцируемая NO-синтаза

IRF - interferon regulatory factor, регуляторный фактор интерферонов

JAК - Janus kinase, янус киназа

KIR - killer-cell immunoglobulin-like receptors, иммуноглобулинподобный рецептор НК

LC3 - microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, 1A/1B-легкая цепь 3 белка, ассоциированного с микротрубочками, маркера аутофагии

LFA-1 - lymphocyte function-associated antigen 1, функционально ассоциированный антиген лимфоцитов 1

L-NMMA - N^G-монометил-L- аргинина

LPS – lipopolysaccharides, липополисахариды

МАРК - mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа

МВР - myelin basic protein, основной белок миелина

МНС-I - major histocompatibility complex I, главный комплекс гистосовместимости I типа

МIF – macrophage migration inhibitory factor, фактор, ингибирующий миграцию макрофагов

МIP- macrophage inflammatory protein, воспалительный белок макрофагов

МMP – matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа

MT-2 - human regulatory T cell-like cell line, клеточная линия, подобная регуляторным T-лимфоцитам человека

MOG 35-33 - пептид основного белка миелина

MyD88 – myeloid differentiation primary response gene, ген первичного ответа миелоидной дифференцировки

mTOR - mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина у млекопитающих

NCAM – neural cell adhesion molecule, нейрональная молекула клеточной адгезии

NKG2A - the inhibitory NK cell receptor, ингибирующий рецептор натуральных киллеров

NF-κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор «каппа-би»

NO – nitric oxide, оксид азота II

NOD1 - nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1, белок, содержащий олигомеризующий нуклеотидсвязывающий домен 1

p27Kip1 - cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, ингибитор циклин-зависимой киназы 1B

p53 - tumor suppressor p53, транскрипционный фактор-супрессор опухоли

p65 - NF-κB p65 subunit – субъединица NF-κB

p-Akt – phospho-protein kinase B, фосфоформа протеин киназы B

PD-L1 - programmed death-ligand 1, лиганд к рецептору программируемой клеточной гибели 1

PD-1 - programmed cell death 1 - рецептор программируемой клеточной гибели 1

p-ERK – phospho-extracellular signal-regulated kinase, фосфоформа ERK

PGE2 - prostaglandin E2, простагландин E2

PLP - myelin proteolipid protein, миелиновый протеолипидный белок

poly(I:C) - polyinosinic:polycytidylic acid, поли-инозиновая-поли-цитидиловая кислота

Rag - Ras-related GTPases, семейство относящихся к RAS GTPаз, изоформы A, B, C, D

Ras - small GTPase, малая GTP-аза

RBL1 - retinoblastoma-like protein 1, ретинобластома-подобный белок 1

S6K – ribosomal protein kinase, рибосомальная протеинкиназа

SH-SY5Y - human neuroblastoma derived cell line, линия нейробластомы человека

SEM – стандартная ошибка среднего значения

SDF1- α - stromal cell-derived factor-1, стромальный клеточный фактор 1 α

STAT - signal transducer and activator of transcription, передатчик сигнала и активатор транскрипции

SMAD – kinases homologies to the *Caenorhabditis elegans* SMA ("small" worm phenotype) and *Drosophila* MAD киназы, являющиеся гомологами продуктов генов *C. elegans* Sma и *Drosophila* Mad

SOCS1 - suppressor of cytokine signaling 1, супрессор сигнального пути цитокинов 1

Sp1 - specificity protein 1, белок специфичности 1

STAT – signal transducer and activator of transcription factors family, семейство транскрипционных факторов - сигналы трансдукции и активации транскрипции

SUMO - small ubiquitin-like modifier, малый убиквитин-подобный модулятор

TAZ- transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, транскрипционный фактор, коактиватор содержащий в себе PDZ- связывающий мотив

T-bet - T-box transcription factor, T-box фактор транскрипции

Tfh – T follicular helper cells, фолликулярные Т-хелперы

TGF- β - transforming growth factor beta, фактор роста опухоли - β

Th – T helper, Т-хелпер

Tregs – T regulatory cells, Т-регуляторные клетки

TLRs - toll-like receptors, toll-подобные рецепторы

TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли

TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand, лиганд, относящийся к семейству TNF, вызывающий апоптоз

TSG-6 - tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein, белок, стимулированного TNF- α гена

6

VEGF - vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов

VCAM-1 –vascular cellular adhesion molecule 1, васкулярная молекула клеточной адгезии

1

VLA-4 - very late antigen-4, очень поздний антиген 4

WARS - tryptophanyl-tRNA synthetase, триптофанил-тРНК-синтетаза

Wnt – Wnt signaling pathway, внутриклеточный сигнальный путь у животных, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей

7-AAD – 7-аминоактиномицин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Хроническое воспаление – это сложный патологический процесс, который приводит к дисфункции органов и тканей. В развитии хронического воспаления важную роль играет нарушения контроля пролиферации, дифференцировки и физиологической активности клеток иммунной системы [120, 155]. За последние годы значительно увеличилось количество хронических аутоиммунных заболеваний, связанных с хроническим воспалением [76]. Однако до сих пор не найдены эффективные методы их терапии. Открытие у мезенхимных стромальных клеток (МСК) иммуномодулирующих свойств в сочетании с их низкой иммуногенностью *in vitro* и *in vivo* [20] позволяет предположить возможность их использования как альтернативного подхода в терапии аутоиммунных заболеваний. Вместе с тем появляются клинические данные, показывающие неэффективность применения МСК [164, 184, 294]. Несмотря на активное изучение данной проблемы, остается много нерешенных и противоречивых вопросов. В связи с этим, необходимы дальнейшие исследования, целью которых является детальное изучение и расшифровка молекулярных механизмов взаимодействия между МСК и клетками иммунной системы, в частности, лимфоцитами, как основными участниками, запускающими аутоиммунные реакции.

Степень разработанности темы исследования

Согласно современным представлениям, при развитии патологических состояний механизмы регуляции иммунитета играют ключевую роль [197]. В настоящее время обнаружены иммунорегулирующий, пролиферативный и репаративный потенциалы МСК [20, 125]. В условиях воспаления установлено иммуносупрессорное влияние МСК на клетки иммунной системы, особенно на лимфоциты [234]. Применение МСК для лечения хронического воспаления затруднено в связи с недостаточной характеристикой механизмов взаимного влияния МСК и лимфоцитов. Знания в этой области остаются неполными. В первую очередь, это касается поведения клеток *in vivo* в связи с большим числом факторов, влияющих как на МСК, так и на лимфоциты. При этом не все эти факторы удается детектировать и оценить в экспериментах на животных. Кроме того, большинство данных относительно МСК человека получено в экспериментах *in vitro*, результаты которых часто противоречат друг другу. Изучение механизмов взаимодействия между МСК и лимфоцитами выявило сложную систему регуляции, контролирующую как воспаление, так и

регенерацию [2–4]. В рамках существующих представлений секретом лимфоцитов создает воспалительное микроокружение. МСК, в свою очередь, в результате полученных от лимфоцитов сигналов, активируют гены, кодирующие ферменты, которые негативно влияют на активацию и жизнеспособность лимфоцитов. Несмотря на общее понимание процесса взаимодействия МСК и лимфоцитов и идентификацию молекул, принимающих участие в реализации этого взаимодействия между двумя типами клеток, остается много неизученных на клеточном и молекулярном уровнях аспектов, требующих исследования [75]. В литературе описаны несколько эффекторных молекул, критически важных для влияния МСК на лимфоциты, среди них - индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO) [61], оксид азота II (NO) [226], простагландин E2 (PGE2) [10]. Однако в последнее время стали появляться работы об участии других факторов, таких как галектины [429], белок TSG6 (белок, стимулированного TNF- α гена 6) [145] и ряд других. Это указывает на то, что взаимодействие МСК и лимфоцитов гораздо сложнее, чем представлялось ранее. Контактные механизмы, идентификации которых посвящены немногочисленные исследования, охарактеризованы гораздо хуже. Установлено, что в контактных взаимодействиях МСК и лимфоцитов могут принимать участие следующие мембранные рецепторы/лиганды: Fas/FasL [12], PD-1/PD-L1 [167], а также молекулы адгезии ICAM-1, VCAM-1 [228] и другие. Однако большинство механизмов установлено на мышиных МСК, а участие целого ряда контактных механизмов не подтверждено на МСК человека. Помимо этого, до сих пор не решен вопрос о балансе между контактными и бесконтактными молекулярными механизмами действия МСК на лимфоциты [14, 253].

Цель исследования – установить механизмы иммунорегулирующего влияния мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека на лимфоциты (CD4 Т-хелперы) в культурах *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Установить, как мезенхимные стромальные клетки влияют на лимфоциты в условиях отсутствия и стимуляции Т-клеток.
2. Обнаружить в мезенхимных стромальных клетках наличие изменений транскрипционной активности генов (IDO, NOS2, PTGS2, TGFB), ответственных за иммуносупрессию при совместной инкубации с лимфоцитами.

3. Оценить изменение уровня и активности белков, которые наиболее важны для осуществления иммуносупрессии активированных Т-клеток под действием мезенхимных стромальных клеток.
4. Определить молекулы адгезии, влияющие на иммуносупрессию лимфоцитов, оказываемую мезенхимными стромальными клетками.
5. Охарактеризовать изменения поверхностного фенотипа мезенхимных стромальных клеток и лимфоцитов при совместной инкубации.

Объект и предмет исследования: мезенхимные стромальные клетки жировой ткани и Т-лимфоциты человека, молекулярные регуляторные механизмы взаимодействия между клетками

Теоретической и методологической базой исследования диссертации являются экспериментальные научные работы, клинические исследования, теоретические обзоры и методические разработки отечественных и зарубежных авторов, посвященные изучению иммунорегуляторных свойств мезенхимных стромальных клеток *in vivo* и *in vitro*.

Информационной базой исследования являются научные статьи в рецензируемых научных журналах, монографии, материалы конференций, соответствующие научной тематике.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология согласно пункту 6.

Научная новизна работы

В рамках данной работы впервые установлена роль межклеточной молекулы адгезии первого типа ICAM-1 в иммунорегулирующей программе МСК человека. В эксперименте обнаружено участие молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 на поверхности МСК человека в иммуносупрессии, связанной с регуляцией уровня α -субъединицы рецептора IL-2 (CD25) на поверхности лимфоцитов.

Впервые для МСК человека продемонстрировано, что блокирование ICAM-1 специфическими антителами на поверхности МСК не влияет на синтез, секрецию и ферментативную активность индоламин-2,3-диоксигеназы IDO – фермента, участвующего в метаболизме триптофана.

Показано, что при взаимодействии с активированными лимфоцитами человека в МСК происходит индукция синтеза IDO на транскрипционном и трансляционном уровнях.

Впервые в системе *in vitro* установлена способность МСК поддерживать выживание интактных Т-лимфоцитов при отсутствии стимуляции, сопровождающееся увеличением уровня CD25 и ICAM-1 на поверхности Т-клеток.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе работы была создана *in vitro* модель, позволяющая оценить иммуносупрессорный потенциал МСК человека. Получены данные, подтверждающие важность контактных взаимодействий в иммуносупрессии МСК человека, в частности, показана роль взаимодействия молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов. В связи с этим, ICAM-1 может рассматриваться как новая терапевтическая мишень для лечения аутоиммунных заболеваний.

Методология и методы диссертационного исследования

В рамках данной работы МСК получали из подкожно-жировой клетчатки пациентов, не страдающих аутоиммунными заболеваниями, лимфоциты - из венозной крови здоровых доноров. Очищенную популяцию CD4 Т-хелперов получали окрашиванием флуоресцентными антителами с последующим выделением на клеточном сортере. В работе использовали методы цитометрии, оценку пролиферации с помощью красителя CyQUANT®NF, ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинг, ингибиторный анализ, блокировку антителами и флуоресцентную микроскопию с применением красителей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При активации Т-клеток МСК оказывают иммуносупрессорное действие на CD4 лимфоциты, которое проявляется в подавлении их пролиферации, связанном со снижением поверхностного уровня CD25 Т-клеток.
2. Активация иммуносупрессорной программы МСК не приводит к изменению уровня фенотипических маркеров, таких как CD90 (заякоренный белок с варибельным

иммунноглобулиноподобным доменом), CD105 (эндоглин), CD73 (экто-5`-нуклеотидаза).

3. Бесконтактная и контактная инкубация МСК и активированных лимфоцитов приводит к иммуносупрессии Т-клеток, опосредуемой активно-стью индоламин-2,3-диоксигеназы - IDO.
4. Молекула межклеточной адгезии ICAM-1 важна для контактной иммуносупрессии, реализуемой МСК, и не влияет на реализацию бесконтактной иммуносупрессии.
5. МСК способны поддерживать выживание интактных Т-лимфоцитов в отсутствии стимуляции, сопровождающееся увеличением поверхностного уровня CD25 и молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 на CD4 Т-хелперах.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным числом экспериментов, воспроизводимыми данными, применением современных биохимических и молекулярных методов, корректным статистическим анализом и критической оценкой полученных результатов с данными литературы.

Материалы диссертации доложены: на 10-м ежегодном съезде общества по изучению стволовых клеток (ISSCR) (Япония, Йокогама, 2012); IV съезде физиологов СНГ (Сочи, 2014); 2-м Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2015); Всероссийском конгрессе с международным участием «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2016); 43-м съезде Европейской Федерации биохимических обществ (FEBS) (Чехия, Прага, 2018)

Личное участие автора. Работа полностью выполнена автором, включая анализ научной литературы, получение биологического материала, разработку экспериментов, получение, обработку и анализ результатов, подготовку публикаций.

Публикации. Материалы диссертации отражены в 9 опубликованных печатных работах, из них 3 статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на со-

искание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, 1 статья, не входящая в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, 5 публикаций в материалах российских и международных конференций.

Внедрение результатов работы. Основные результаты диссертационной работы внедрены в научно-практическое применение кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а также в рутинную практику лаборатории регенеративной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Объем и структура научно-квалификационной работы

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и дополнена иллюстративным материалом в количестве 36 рисунков и 5 таблиц. Текст диссертации состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, и списка литературы, включающего 8 отечественных и 305 зарубежных источников.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

«Взаимное влияние МСК и клеток иммунной системы»

1. Мезенхимные стромальные клетки: открытие, характеристика, фенотип и функции

Выдающийся ученый Александр Яковлевич Фриденштейн и его коллеги обнаружили необычные клетки в ходе исследования остеогенного потенциала костного мозга. Эти клетки крепко прикреплялись к пластику, синтезировали коллагены I и III типов, не несли маркеров эндотелиальных клеток [87] и секретировали цитокины, хемокины и белки внеклеточного матрикса [60, 276]. Впоследствии за этими клетками закрепилось два названия: мезенхимные стромальные клетки (из стромы костного мозга), либо мезенхимные стволовые клетки. Термин мезенхимные стромальные клетки, вероятно более точен, поскольку содержание «настоящих» стволовых клеток в составе выделяемых культур на практике невелико. В популяции МСК выявлена небольшая субпопуляция клеток (~20%), несущая ингибитор орнитин декарбоксилазы – маркер неделящихся клеток [51]. В данной работе будет использован термин мезенхимные стромальные клетки (МСК). На данный момент удалось выделить МСК из большинства тканей взрослого человека. Проще всего МСК выделить из костного мозга, жировой ткани, крови и плаценты. Помимо этих тканей, МСК были обнаружены в надкостнице, мышечной ткани, печени, поджелудочной железе, головном мозге, дерме кожи и других. [29, 202, 304]. Морфологически МСК сильно гетерогенны, что делает невозможным их идентификацию методами световой микроскопии [122]. Поэтому международным обществом по клеточной терапии, ISCT, было предложено характеризовать МСК по поверхностным маркерам, обнаруженным на популяции первично выделенных мезенхимных клеток костного мозга; среди них: CD105 (эндоглин, рецептор TGF-β3, который, как полагают, участвует в хондрогенной дифференцировке и взаимодействии с гематопозитическими клетками [79], CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) [231] и CD90 (N-гликозилированный заякоренный белок с варибельным иммуноглобулиноподобным доменом). Такой фенотипический подход имеет существенные недостатки, поскольку не существует набора поверхностных маркеров, специфичных только для МСК. Поэтому, чтобы доказать, что клетки являются МСК, принято проводить функциональные тесты, определяющие способность клеток к дифференцировке в, как минимум, три типа клеток: жировые, костные и хрящевые [70]. На данный момент также экспериментально подтверждены молекулярные механизмы дифференцировки МСК в

ряд других клеток, например, нейрального происхождения. Вопросы изучения дифференцировки МСК в первую очередь связаны с перспективами их терапевтического использования для репарации и заживления тканей.

Участие МСК в процессе заживления тканей активно изучают [3, 5–8, 289]. Современные представления таковы: из поврежденных и апоптотных клеток высвобождаются факторы, которые способствуют мобилизации и направленной миграции МСК в очаг повреждения или воспаления. МСК в зоне повреждения способствуют регенерации ткани двумя способами: путем встраивания и дифференцировки, замещая погибшие клетки [277], и/или за счет секреции большого числа растворимых белков и регуляторных молекул [189]. Установлено, что процент встраивающихся в поврежденные ткани МСК ткани не велик. При введении МСК животным с поврежденными цисплатином почками процент «дошедших» до почки МСК от общего числа введенных клеток составляет 5-7% [115]. В то же время, при введении человеческих МСК иммунодефицитным мышам при остром инфаркте миокарда не выявлено встраивания введенных клеток в поврежденные зоны сердца. Наряду с этим, доказан факт улучшения сердечного выброса и уменьшения размеров области фиброза [119]. В многочисленных экспериментальных системах показано, что МСК секретируют набор растворимых факторов, которые обуславливают их позитивное влияние на репарацию тканей. Наиболее важные факторы можно разделить на следующие группы: антиапоптотные (нейротрофический фактор мозга (BDNF) и фактор роста тромбоцитов (PDGF) [16, 64]), антифиброзные (HGF, IL-10 и фактор некроза опухоли- α (TNF- α) [270]), ангиогенные (основной фактор роста фибробластов (bFGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF) [389]), реорганизующие внеклеточный матрикс (ММР (матриксные металлопротеиназы), сериновые протеазы, ингибиторы сериновых протеаз и коллаген [267]).

Присутствие МСК в большинстве тканей, таких как мышцы, жировая ткань, печень, головной мозг и других [37, 172, 255, 271], косвенно свидетельствует в пользу того, что при репарации тканей могут использоваться тканевые МСК, а не рекрутированные системно. В частности, было показано, что введение МСК свиньям с индуцированным инфарктом миокарда не только приводило к уменьшению зоны инфаркта, но также и увеличивало в 20 раз популяцию резидентных c-kit⁺ стволовых клеток сердца [109]. В последнее время сформулирована гипотеза о совместном участии резидентных МСК тканей

(прогениторные клетки) и МСК, пришедших извне, в репарации повреждений. Принято считать, что именно наличие резидентных МСК (прогениторных клеток) является основой для самообновления любой ткани и поддержания ее гомеостаза [63, 125, 134]. В случае повреждения или воспаления, в первую очередь, реагируют резидентные прогениторные клетки, но если их усилий недостаточно, то привлекаются МСК из сторонних источников, которые за счет паракринных эффектов способствуют ускорению регенерации и восстановлению функциональной активности поврежденной ткани. [39, 141].

В большинстве работ по повреждению органов авторы отмечают роль мощного воспалительного ответа, который препятствует индукции регенеративных процессов. Введение же МСК способствует снижению уровня воспаления [121, 216, 311]. В работе с применением модели индуцированного инфаркта левой почки у крыс анализ сыворотки животных после введения МСК костного мозга человека выявил значительное снижение воспалительных цитокинов, таких как интерлейкины 1α , 1β (IL- 1α , IL- 1β), интерферон- γ (IFN- γ), TNF- α [250]. Этот результат свидетельствует об иммуносупрессорном эффекте МСК. В связи с увеличением числа работ, подтверждающих негативное влияние МСК на активацию клеток иммунной системы, возник вопрос об идентификации механизмов действия МСК на клетки иммунной системы.

2. Иммунорегуляторная активность МСК

2.1 Воспаление и хроническое воспаление при регенерации тканей

Большинство современных исследователей признает, что воспаление – это комплексный физиологический ответ, индуцируемый в тканях, в первую очередь, клетками иммунной системы [108]. В норме, повреждение клеток под действием тепла, механических травм, химических ожогов инициирует развитие совокупности клеточных реакций, получивших название воспаления. Инициаторами воспаления являются тучные клетки и тканевые макрофаги. При узнавании константных молекулярных паттернов, характерных для инфекционных агентов или погибающих клеток, они секретируют медиаторы воспаления: фактор некроза опухоли TNF- α , IL- 1β и интерлейкин 6 (IL-6), низкомолекулярные простагландины и лейкотриены. Рецепция этих биоактивных молекул клетками стенок сосудов приводит к активации эндотелия и увеличению проницаемости сосудов исключительно для клеток иммунной системы (Рис. 1.). Эта селективность обеспечивается за счет контактного взаимодействия между селектинами на поверхности эндотелия и инте-

ринами на поверхности клеток иммунной системы [209]. Увеличение проницаемости сосудов позволяет проникать в очаг воспаления набору белков плазмы, входящих в систему комплемента. Белки системы комплемента способствуют секреции тучными клетками TNF- α , воспалительного белка макрофагов 2 (CXCL2) и интерлейкина 8 (IL-8) [293]. Это приводит к направленной миграции в зону воспаления специализированных фагоцитирующих клеток, нейтрофилов и моноцитов (Рис. 1.), чья задача заключается в уничтожении чужеродных организмов, удалении некротизированных участков ткани, погибших во время повреждения, и обломков мертвых клеток [312]. К сожалению, уничтожающая активность нейтрофилов и моноцитов, а особенно продукция активных форм кислорода (АФК), не избирательна, поэтому вместе с чужеродным материалом или пораженными инфекцией клетками гибнут и здоровые участки ткани (Рис. 1.), находящиеся вблизи очага воспаления [146].

В норме устранение вызвавшей воспаление причины приводит к его прекращению. Во время этой стадии нейтрофилы превращают воспалительные факторы, простагландины и лейкотриены, в липоксины – вещества, предотвращающие развитие воспаления (Рис. 1.). Это препятствует направленной миграции новых нейтрофилов и способствует привлечению моноцитов, которые «убирают» погибшие клетки и инициируют ремоделирование ткани [251]. Также происходит альтернативная активация макрофагов, переключающая их из провоспалительного M1 в противовоспалительный M2 фенотип (Рис. 1.). Они начинают продуцировать и секретировать противовоспалительные факторы, такие как трансформирующий фактор роста TGF- β и интерлейкин 10 (IL-10), резолвины и протектины [99].

В итоге, нейтрофилы погибают от апоптоза, а в зону повреждения приходят фибробласты и МСК (Рис. 1.), которые продуцируют и секретуют MMPs и белки внеклеточного матрикса (ECM), в том числе коллаген, инициируя фазу репарации [2]. Они готовят новую матриксную основу для прикрепления резидентных прогениторных клеток, которые в результате дифференцировки полностью заместят поврежденный участок

ткани новыми клетками. Параллельно с этим макрофаги покидают зону повреждения через лимфатическую систему.

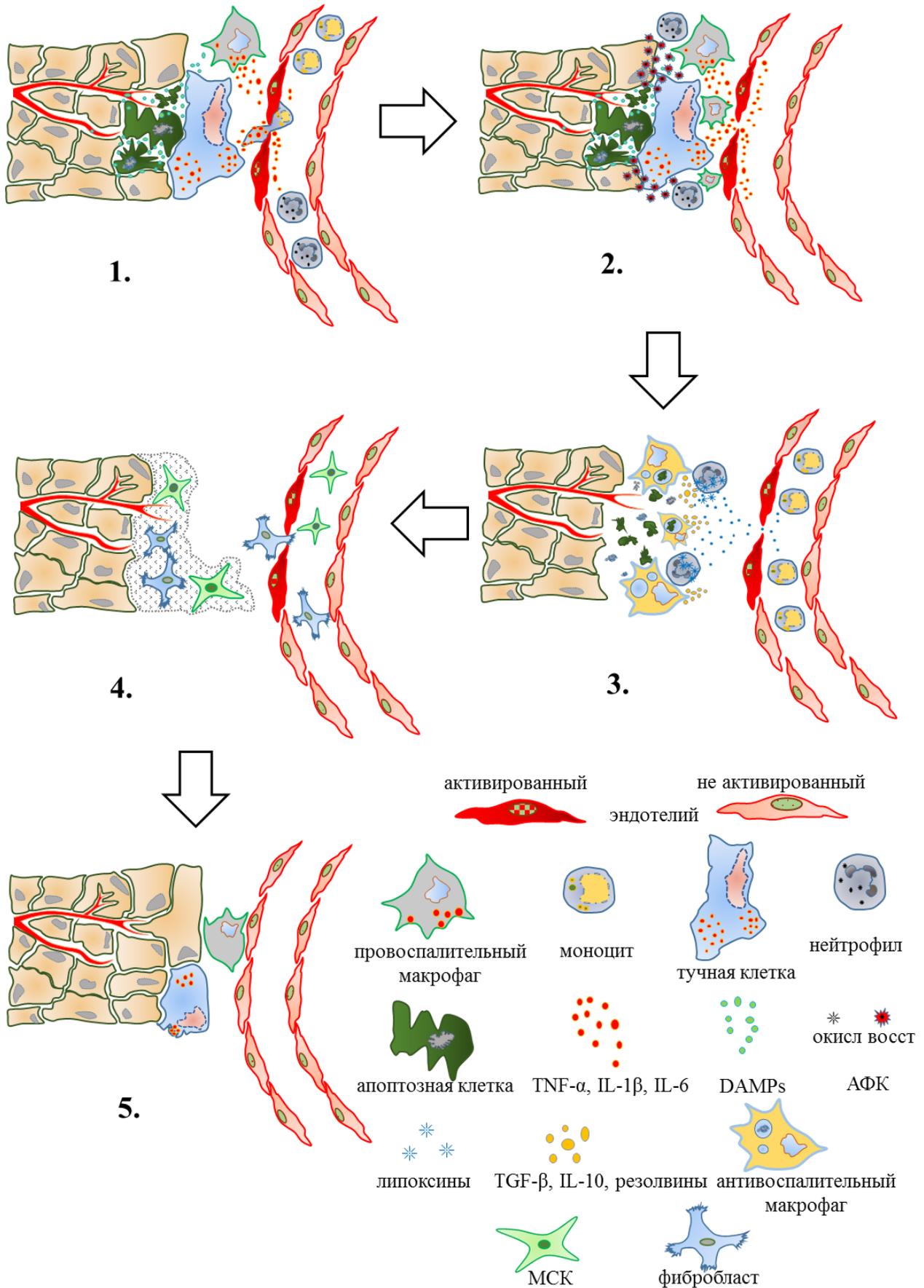


Рис. 1. Схема воспалительного процесса, завершающегося полной регенерацией ткани.

При таком «классическом» протекании воспалительного процесса и дальнейшей репарации, переходящей регенерацию, организму удастся сохранить функциональную активность ткани. Стоит отметить, что каждая из перечисленных стадий подчинена сложной и многоуровневой регуляции. Особенно это касается стадии воспалительного ответа. Если из-за разбалансировки механизмов регуляции иммунного ответа его не удастся остановить, то развивается хроническое воспаление [197].

Хроническое воспаление возникает из-за нарушения регуляции воспалительного процесса, в ходе которого, вместо терминации, происходит дополнительная активация клеток-участников воспаления. Довольно часто длительно сохраняющийся воспалительный стимул постепенно смещает нормальный физиологический воспалительный ответ в сторону бесконтрольной реакции, как это нередко происходит при аутоиммунных заболеваниях. Например, в случае атеросклероза, клетки эндотелия сосудов подвержены перманентному окислительному стрессу, вследствие накопления модифицированных бактериями липидов [155, 156].

В результате, из очага воспаления невозможно удалить воспалительные факторы, так как вместо того, чтобы остановить воспалительную программу и покинуть зону очага воспаления активированные лейкоциты продолжают их секретировать наряду с АФК. Суммарный эффект приводит к повреждению прилегающих здоровых участков ткани, что инициирует их фибротизацию и последующий некроз [120]. Известен целый спектр заболеваний, патогенез которых связан с развитием хронического воспаления, например, астма, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, хронический простатит, болезнь Крона, саркоидоз, васкулит, хроническая обструктивная болезнь легких и другие [76].

Установлено, что введение МСК или кондиционированной среды от них способствует прекращению воспалительного ответа. Особенно выражено противовоспалительное действие МСК в случае патологий, связанных с хроническим воспалением. Таким образом, исследователи пришли к выводу, что концепция регенеративного процесса ткани нуждается в серьезном дополнении. МСК, по-видимому, нужны не только на стадии репарации, но и во время воспаления, где активно участвуют в регуляции иммунного ответа и терминации воспалительной фазы [194, 224].

2.2 Молекулярная иммунорегуляторная программа МСК

Первое полноценное исследование, посвященное влиянию МСК на клетки иммунной системы, было проведено Amelia M. Bartholomew вместе с коллегами. *In vitro* было установлено, что добавление МСК павиана значительно снижает пролиферацию аллогенных лейкоцитов периферической крови (ЛПК), активированных конкавалином А, либо в смешанных культурах лимфоцитов. Помимо этого, введение павианам аллогенных МСК при трансплантации чужеродного участка кожи способствовало его приживлению [20].

В дальнейшем было показано, что МСК мало иммуногенны за счет отсутствия маркера главного комплекса гистосовместимости II типа (HLA-DR), являющегося рецептором для Т-хелперов [142, 223]. На поверхности МСК отсутствуют следующие молекулы: рецептор семейства факторов некроза опухоли 5 типа (CD40), лиганд CD40 (CD40L), молекула антигенпрезентирующих клеток для активации Т-лимфоцитов (CD80) и молекула праймирования Т-лимфоцитов (CD86) [135], необходимые для оптимальной стимуляции антиген-специфических Т-клеток. Недавно стало известно, что МСК также способны блокировать систему комплемента [143]. На поверхности МСК были обнаружены ингибиторы системы комплемента, такие как мембранный кофакторный белок (CD46), фактор ускорения распада комплемента (CD55), ингибитор атакующего мембрану комплекса (CD59), которые способны частично помешать ее активации [186, 282]. Но если атакующий мембрану комплекс связался с МСК, клетка погибает [152]. Перечисленные выше факторы позволяют МСК избегать иммунного ответа.

Попав в очаг повреждения, МСК подвергаются действию растворимых факторов, продуцируемых и секретируемых иммунными клетками. В первую очередь это: TNF- α , IL-1, IFN- γ , PDGF, VEGF, хемокины C-C хемокин лиганд и C-X-C хемокин лиганд семейств (CCL, CXCL), свободные радикалы, лейкотриены, белок-хемоаттрактант моноцитов 1 (MCP-1), MIP-1a, IL-8 и другие [254, 295]. Считают, что этот спектр растворимых факторов достигает МСК и запускает в них иммуносупрессорную программу, которая является комплексной и состоит из контактных взаимодействий и контакт-независимых механизмов [102]. Это приводит к ингибированию активности всех иммунных клеток в очаге воспаления: снижению их пролиферации и секреторной функции. В отсутствии воспалительных стимулов иммуносупрессорная программа МСК выключена [256].

Исследователи полагают, что МСК способны проводить «мониторинг и анализ» огромного числа факторов микроокружения, а не только провоспалительных цитокинов,

как считали раньше [26]. На основе этого анализа МСК реализуют регуляторную программу по контролю воспаления, задача которой состоит не просто в подавлении или поддержке активности клеток иммунитета, а возврату к нормальным физиологическим условиям ткани или органа [128]. В моделях реакции трансплантата против хозяина (GvHD) показано, что одновременное введение МСК вместе с неспецифическими иммуносупрессантами, например, циклоспорином А, не приводит к выраженному терапевтическому эффекту, а скорее усиливает пролиферацию лимфоцитов [111, 117].

4. Иммуносупрессорное действие МСК на клетки иммунитета

4.1 Участие лимфоцитов в хроническом воспалительном процессе

Большинство исследований по изучению иммуносупрессорных свойств МСК проводились в основном с Т-лимфоцитами в связи с их важностью в развитии аутоиммунных патологий. Т-клетки принято делить на два больших семейства разделенных на дополнительные подклассы (клетки памяти, хелперы разных типов, киллеры, регуляторные клетки). Принадлежность к тому, либо другому семейству определяет уровень поверхностного мономерного трансмембранного гликопротеина надсемейства Ig (CD4) или трансмембранного гликопротеина, служащего корецептором Т-клеточных рецепторов (CD8), а также синтез специализированных факторов транскрипции и способность секретировать определенные цитокины. Когда Т-клетки узнают презентируемый им антиген, они переходят из наивного состояния в зрелый функциональный фенотип и инициируют адресно направленный ответ именно на этот антиген. Ответ может заключаться в цитотоксической атаке клеток, несущих на своей поверхности антиген, стимуляции продукции антител В-клетками, активации фагоцитов и создании локального воспалительного микроокружения [207].

Исследования последних лет показали, что Т-клетки необходимы для поддержания иммунного ответа в случае, если первое звено врожденного иммунитета (нейтрофилы и макрофаги) не справляется с последствиями повреждения (инфекции). Т-клеточный ответ является последним и наиболее мощным рубежом защиты организма от патогенов. Поэтому в норме он контролируется сложной многоуровневой системой регуляции, так как его разбалансировка приводит к хроническому воспалительному процессу, сопровождаемому аутоиммунными заболеваниями и тяжелыми повреждениями тканей [176, 243, 244].

На данный момент важная роль Т-клеток отмечена в патогенезе таких заболеваний, как: рассеянный склероз, ревматоидный артрит, диабет 1 типа, астма, аллергия, болезнь Крона [59, 129, 139, 179, 291].

Несмотря на то, что получены многочисленные данные об иммуносупрессорном действии МСК на Т-клетки в условиях *in vivo* и *in vitro*, точные механизмы до сих пор не охарактеризованы. Однако удалось установить, что глобально МСК действуют в двух направлениях: они способны блокировать дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в воспалительные фенотипы и, наоборот, способствовать их превращению в противовоспалительные [159, 213], а также снижать функциональную активность уже зрелых Т-клеток, при этом не убивая их. Помимо этого, в литературе описаны случаи инициации спонтанного апоптоза лимфоцитов под действием МСК [131].

4.2 МСК влияют на дифференцировку различных популяций Т-клеток

4.2.1 CD4 Т-клетки: разнообразие, созревание и функции

Самой многочисленной популяцией Т-клеток являются CD4 лимфоциты. CD4 Т-клетки секретируют растворимые факторы-цитокины, которые активируют соседние Т-клетки, а также клетки миелоидного происхождения, макрофаги и дендритные клетки, а также осуществляют т.н. «помощь» В-клеткам, которая необходима для эффективной выработки антител. Исключительное разнообразие патогенов (вирусы, бактерии, паразиты) и их индивидуальные молекулярные паттерны заставили иммунную систему эволюционировать, что привело к появлению специализированных популяций CD4 Т-клеток, специализирующихся на защите от различных классов патогенов. В данный момент хорошо охарактеризованы субпопуляции Т-хелперов, таких как: Т-хелперы 1 (Th1), Т-хелперы 2 (Th2), Т-хелперы 17 (Th17) и Т-регуляторные клетки (Tregs). Однако большинство исследователей сходится на том, что таких субпопуляций намного больше, например, недавно были открыты Т-хелперы 9 (Th9), фолликулярные Т-хелперы (Tfh). Обнаружение и описание функциональной активности этих новых субпопуляций – важная задача для дальнейшего изучения механизмов острого и хронического воспаления [207].

Известно, что дифференцировочную судьбу наивных Т-клеток, наряду с сигналом через Т-клеточный рецептор, диктует микроокружение. Так, интерфероны α , β и IL-12, генерируемые клетками врожденного иммунитета в ответ на внутриклеточный патоген, способствуют дифференцировке Т-клеток в Th1 за счет активации Т-box транскрипционного фактора (T-bet) [192, 267]. Th1 продуцируют большое количество IFN- γ и TNF- α .

Когда наивные Т-клетки попадают в микроокружение с преобладанием ИЛ-4, продуцируемого клетками врожденного иммунитета в ответ на внеклеточных паразитов, они дифференцируются в Th2 [82]. Стимулированные Th2 продуцируют большое количество ИЛ-4, ИЛ-5, и ИЛ-13 [272].

В ответ на внеклеточные бактерии и грибы клетки врожденного иммунитета генерируют большое количество TGF- β и ИЛ-6. Когда наивные Т-клетки принимают эти сигналы в совокупности со стимуляцией ИЛ-21 и ИЛ-23, они дифференцируются в Th17 [116, 175]. Накопленные экспериментальные данные по изучению иммуносупрессорной программы МСК показывают, что МСК активно регулируют дифференцировку наивных CD4 лимфоцитов [266].

4.2.2 МСК влияют на дифференцировку Th1 и Th2 лимфоцитов

В условиях *in vitro* совместное культивирование МСК костного мозга человека с наивными лимфоцитами, выделенными из селезенки мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ), индуцированным основным белком миелина MOG35-55, приводило к снижению в среде уровня IFN- γ и значительному увеличению ИЛ-4. Это свидетельствовало о блокировке МСК дифференцировки Th1 и способствовало развитию Th2 лимфоцитов, препятствуя образованию новых Th1 Т-клеток. [17] Этот эффект наблюдали также и в культурах человеческих лимфоцитов с МСК. Наивные Т-клетки в условиях *in vitro* активировали и дифференцировали либо в направлении Th1, либо - Th2. В случае Th1 совместная инкубация с МСК приводила к значительному снижению секреции IFN- γ . В то же время МСК способствовали многократному увеличению секреции ИЛ-4 в случае Th2 [10]

In vivo у мышей с индуцированным ЭАЭ введение человеческих МСК, помимо улучшения клинической картины, приводило к снижению уровня воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-2, IFN- γ , TNF- α . Одновременно регистрировали значительное увеличение уровня ИЛ-4 и ИЛ-5 в среде. Полученные данные свидетельствуют о способности МСК индуцировать дифференцировку наивных Т-клеток в Th2 [17].

Программа иммуносупрессии Т-клеток с помощью МСК гибкая и ее реализация зависит от степени активности популяций Т-хелперов и микроокружения. В условиях острого аутоиммунного хронического воспаления слизистой носа выделенная из воспаленной ткани пациентов фракция лимфоцитов обладала повышенной активностью Т-клеток по

сравнению с контролем (лимфоциты слизистой носа здоровых доноров). Данную фракцию рестимулировали фитогемагглютинином (ФГА) и затем добавляли к МСК жировой ткани. Последующий анализ показал, что МСК значительно снижают уровень IL-4 и IL-5 в супернатантах после совместной инкубации. В то же время, уровни IL-2 и IFN- γ , а также IL-10 и TGF- β были повышены. Данное наблюдение говорит о смещении МСК баланса между Т-хелперами в сторону Th1 и регуляторных Т-клеток [48].

4.2.3 МСК участвуют в регуляции дифференцировки Th17 и Treg лимфоцитов

Также в литературе отмечено участие МСК в регуляции других типов хелперных клеток, таких как Th17. Пациенты с генетическими нарушениями в созревании и функции этих Т-клеток страдают от тяжелых бактериальных и грибковых инфекций [215]. Результаты недавних исследований показали, что Th17 оказались участниками многих аутоиммунных патологий, среди них: рассеянный склероз [110], ревматоидный артрит, аутоиммунный миокардит [222], болезнь Крона [88], так как во всех перечисленных патологиях отмечают важную роль IL-17. [130]. При изучении иммуносупрессорных свойств МСК было обнаружено, что эти клетки успешно блокируют дифференцировку и функциональную активность Th17 как *in vitro*, так и *in vivo*. В частности, на человеческих клетках *in vitro* было показано, что несмотря на добавление индукторов дифференцировки, таких как IL-6, IL-23 и TGF- β , МСК полностью блокировали дифференцировку наивных Т-хелперов в Th17 [93].

Помимо эффекторных популяций Т-клеток, которые ассоциированы с аутоиммунными патологиями, у человека и животных существует специализированная регуляторная субпопуляция Т-клеток, Т-регуляторные клетки (Treg), которые необходимы для предотвращения спонтанной активации аутореактивных Т-клеток. Эта нежелательная активация в ответ на собственные антигены лежит в основе большинства системных аутоиммунных патологий. Основная задача Treg – это антиген-специфическая супрессия активированных Т-клеток, а также неспецифическая супрессия и лизис аутореактивных Т-клеток, угнетение созревания и презентации антигенов дендритными клетками [144]. Таким образом, активность Treg является одним из механизмов управления воспалительным процессом, его длительностью и распространением. Пониженный уровень Treg отмечен при аутоиммунных патологиях, связанных с хроническим воспалением, таких как: ревматоидный артрит, атеросклероз, системная красная волчанка и ряде других [11, 144, 188]. Регуляторный фенотип этих клеток определяет экспрессия транскрипционного фактора

Foxp3, который одновременно является мастер-регулятором их дифференцировки. В условиях *in vivo* получены многообещающие результаты по использованию МСК для восстановления баланса Treg в случае различных аутоиммунных патологий. Так на моделях артрита и отторжения трансплантата сердца было показано, что при введении аллогенных МСК животным в обоих случаях возрастает процент Treg. в первом случае в селезенке появлялась стабильная популяция Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺, которые в контрольной группе представляли не больше 0,5 %. [16]. А во втором было показано значительное повышение иммунной толерантности лимфоцитов реципиента, за счет снижения активности Th1 и увеличения процента Treg в тотальной популяции Т-хелперных клеток. [41].

4.2.4 МСК способны управлять дифференцировкой цитотоксических Т-лимфоцитов

Наряду с воспалением, зависящим от активации Т-хелперов (CD4), Т-клеточный ответ приводит к созреванию и активации так называемых цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ), обладающих мощным цитолитическим потенциалом и образующихся при антигенной стимуляции наивных CD8 Т-клеток. Эта популяция уничтожает внутриклеточные патогены, а также опухолевые клетки. Для полноценной дифференцировки CD8 Т-клеткам помимо узнавания антигена необходимы сигналы от рецепторов IFN- α или β и IL-12. Так же как Th1, CD8 Т-клетки продуцируют большое количество IFN- γ и TNF- α . Зрелые активированные ЦТЛ секретируют большое количество везикул, высвобождаемых при контакте с клеткой-мишенью. Содержимое этих везикул представлено белками семейства гранзимов и перфоринов, которые вызывают лизис клеток-мишеней [273]. Поскольку CD8 Т-клетки узнают комплексы МНС-I с антигеном, которые представлены на поверхности почти всех клеток организма, в этом кроется большая опасность: если CD8 Т-клетки получают возможность узнать собственные антигены, они с такой же эффективностью начинают уничтожать здоровые, не пораженные клетки тканей [207].

На данный момент известно, что ЦТЛ - активные участники аутоиммунных патологий, и также являются возможными мишенями регуляции со стороны МСК [237]. Было показано, что МСК могут способствовать развитию регуляторного фенотипа у CD8 клеток. Мышиные CD8⁺ и CD8⁻ спленоциты, предварительно активированные аллогенными спленоцитами, инкубировали с МСК, после чего оценивали пролиферацию Т-клеток. В этих условиях МСК замедляли пролиферацию только в тех образцах, где присутствовали CD8⁺ Т-клетки. После инкубации с МСК тотальная фракция активированных тем же способом

спленоцитов оказывала иммуносупрессорное влияние на активированные аллогенные лимфоциты из другой линии мышей. Этот эффект пропадал, если из инкубируемых с МСК спленоцитов убирали CD8 популяцию [66].

Следует отметить, что дифференцировочный процесс неразрывно связан с активацией, так как только при активации наивных лимфоцитов происходит их дифференцировка в зрелые эффекторные или регуляторные клетки.

4.3 МСК снижают активность Т-лимфоцитов *in vitro*

Культивирование МСК с отдельными популяциями Т-клеток (CD4 и CD8), активированных различными способами, показало, что МСК оказывают свое иммуносупрессорное действие независимо от способа активации (смешанная реакция лимфоцитов, презентация антигена с помощью дендритных клеток, фитогемагглютинин). Помимо этого, было установлено, что эффект иммуносупрессии является дозозависимым, обратимым и не связан с апоптозом клеток [64]. Также было продемонстрировано, что МСК способны ингибировать пролиферацию как наивных Т-лимфоцитов, так и Т-клеток памяти, активированных специфическим антигеном. При этом, Т-клетки памяти после удаления МСК из культуры не отвечают на реактивацию, в отличие от наивных лимфоцитов [138]. Оказалось, что МСК обладают специфичной иммуносупрессией по отношению к лимфоцитам. При отсутствии контактов между клетками в культурах МСК со стимулированными антителами к TCR ЛПК; популяцией Т-лимфоцитов, выделенных с использованием антител к константным субъединицам Т-клеточного рецептора (CD3); либо очищенных CD4⁺ Т-хелперов, иммуносупрессорный эффект МСК проявлялся только в отношении Т-клеток, но не других популяций.

Сам факт иммуносупрессии под действием МСК не объясняет, за счет чего происходит снижение пролиферации лимфоцитов. В одной из работ использовали МСК костного мозга мыши и популяцию Т-клеток с модифицированным Т-клеточным рецептором к специфическому антигену НУ. Было обнаружено, что МСК не блокируют активацию наивных Т-клеток, так как при добавлении НУ-пептида в смешанную культуру МСК и Т-клеток влияния на уровень маркеров активации: α субъединицы рецептора интерлейкина 2 (CD25) и лектина С типа (CD69) обнаружено не было, но при этом синтез провоспалительного IFN- γ и Т-клеточная пролиферация были заблокированы полностью. Если МСК убирали из системы и ре-стимулировали Т-клетки (в частности CD8), то удавалось вос-

становить только секрецию IFN- γ , а пролиферация по-прежнему оставалась заблокированной. Анализ экспрессии циклина D2 и ингибитора циклин-зависимой киназы 1B (p27Kip1) (первый является маркером ранней G1 фазы, а второй блокирует переход из G1 в S фазу клеточного цикла) выявил, что под действием МСК уровень циклина D2 значительно снижен, а уровень p27Kip1 сильно увеличен. При этом картина не менялась после удаления МСК и повторной рестимуляции Т-клеток, лимфоциты восстанавливали секрецию IFN- γ на третий день после рестимуляции, однако пролиферация не восстанавливалась. Стоит отметить, что одновременное добавление и IL-2 и антигена на пролиферацию не влияло. Таким образом, под действием МСК происходит толеризация Т-клеток, состоящая в блокировке пролиферации и снижении секреторной функции лимфоцитов. Помимо этого, продемонстрировано, что данный механизм распространяется как на CD8, так и CD4 популяции Т-лимфоцитов [96].

С точки зрения физиологии, выключение иммунной системы за счет МСК является крайне опасным для поддержания барьерных функций и защиты организма от патогенов. В связи с этим актуален вопрос: проявляется ли иммуносупрессорная активность МСК в любых условиях, или их влияние на лимфоциты более гибкое и реализуется только в определенных условиях? Было показано, что МСК, взаимодействуя с тотальной популяцией ЛПК, активированных фитогемагглютинином, эффективно подавляли пролиферацию и блокировали цитотоксичную активность Т-клеток. Но в случае стимуляции ЛПК специфическими антигенами (*Candida albicans*, *Bordetella pertusis* и столбнячным токсином), присутствующими при остром инфекционном поражении, супрессии со стороны МСК зафиксировано не было. Это впервые позволило говорить о МСК не как об иммуносупрессорах, а об иммунорегуляторах, которые ориентируются на условия микроокружения и в зависимости от них регулируют активность лимфоцитов. [211]. Следует добавить, что данные по иммуносупрессии МСК, полученные *in vitro*, нуждаются в подтверждении *in vivo* на животных моделях аутоиммунных заболеваний человека, патогенез которых связан с избыточной активацией и пролиферацией Т-клеток.

4.4 Молекулярные механизмы иммуносупрессорного влияния МСК на Т-лимфоциты

Основу иммуносупрессорной программы МСК в значительной степени составляют секреторные механизмы, так как в подавляющем большинстве работ для терапевтического и иммуносупрессорного эффекта МСК не требовалось присутствия этих клеток в

очаге повреждения/воспаления. Так даже введения экспериментальным животным супернатанта, содержащего секретиромые МСК факторы, было достаточно для осуществления терапевтического эффекта [10, 275].

Показано, что одним из главных факторов, участвующих в иммуносупрессорной программе МСК человека, является индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO) [61]. Показано, что иммуносупрессорный эффект IDO возрастает в присутствии других молекул, например, простагландина E2 (PGE2) [270]. Также оказалось, что иммуносупрессия МСК видоспецифична, если человеческие МСК используют IDO в сочетании с другими факторами, то мышинные реализуют свою программу через индуцибельную NO-синтазу (iNOS) и синтезируемый ей NO, а крысиные используют сочетание NO и гемоксигеназы (HO-1) [43, 226, 227].

4.4.1 IDO – основной фактор иммуносупрессорной программы МСК человека

IDO был открыт в 1970-х годах, обнаружен во всех тканях кроме печени. Белок, массой около 45 кДа, является мономером, состоящим из двух доменов, и содержит в активном центре гем. [133]. IDO осуществляет реакцию превращения триптофана в N-формилкинуренин (НФК) в кинурениновом пути превращения триптофана в никотинамид [18]. Затем НФК спонтанно или с помощью кинуренин формамидаз превращается в кинуренин [174].

Несмотря на полученную по результатам рентгеноструктурного анализа информацию о пространственной структуре IDO, дебаты о механизме действия фермента ведутся до сих пор. Согласно одной гипотезе, фермент катализирует присоединение протона от N1 к супероксиду, связанному с железом (Рис. 2п2.). Перераспределение электронной плотности индольного кольца инициирует электрофильную реакцию, которая приводит к формированию связи между C3 триптофана и первым атомом кислорода (Рис. 2п3.). Дальнейший разрыв связи между гемом и вторым атомом кислорода приводит к образованию пероксииндоленинового инермедиата. Параллельно происходит встраивание второго атома кислорода, отдача протона и образование четвертичного комплекса диоксетана (Рис. 2п4.), который затем превращается в НФК (Рис. 2п5.) [264].

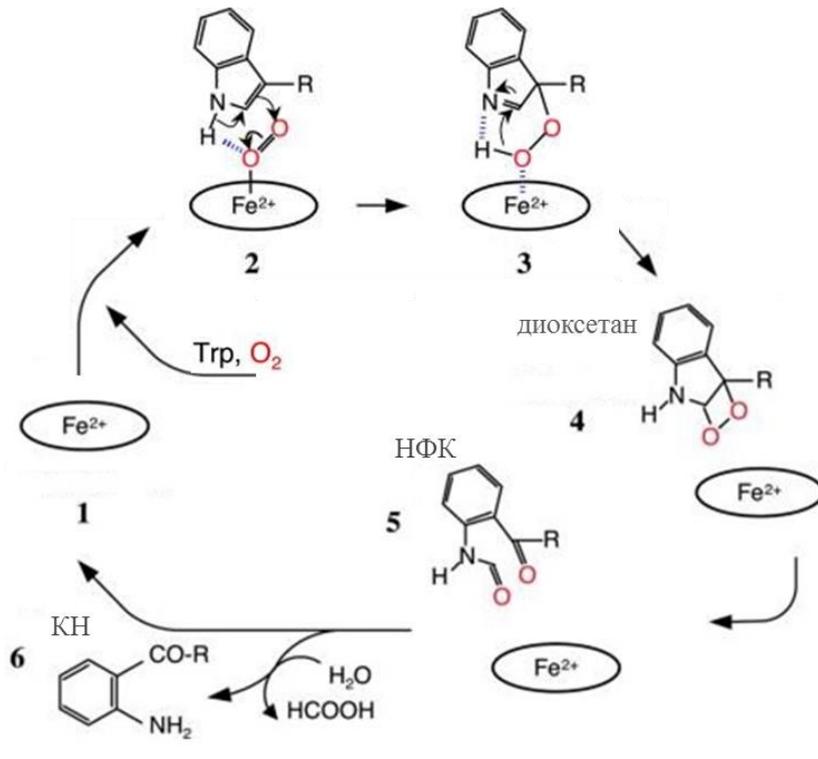


Рис. 2. Механизм превращения триптофана в кинуренин под действием IDO. Адаптировано из [264].

Альтернативный механизм предполагает, что диоксигенная реакция происходит последовательно за счет добавления супероксида, связанного с железом гема. Сначала к C2-C3 связи триптофана присоединяется первый атом кислорода. При этом происходит формирование эпоксидного интерме-

дата. С помощью компьютерного моделирования установлено, что самым энергетически выгодным продолжением реакции является перенос протона от аминогруппы триптофана на эпоксидный кислород. Это приводит к раскрытию цикла и дальнейшей направленной нуклеофильной атаке второго атома кислорода на C2 триптофана. Последующее обратное присоединение протона на аминогруппу приводит к перераспределению электронных плотностей, расщеплению C2-C3 связи и превращению интермедиата в НФК [38].

Важность установления механизма действия IDO связана с тем, что продукция IDO является первым охарактеризованным механизмом защиты опухолевых клеток от активированных лимфоцитов. Поэтому специфическое ингибирование IDO рассматривают как один из возможных вариантов терапии онкологических заболеваний [13, 123].

Продукт активности IDO - кинуренин может превращаться, например, под действием кинуренин-3-гидроксилазы в токсичный для клеток 3-гидроксикинуренин (способен генерировать пероксид водорода [171, 313], который, в свою очередь, в несколько этапов становится хинолиновой кислотой. Показано, что эта кислота способна вызывать гибель Т-лимфоцитов путем апоптоза, активируя в них каспазу 8. [77].

Иммуносупрессорное действие IDO может быть связано со снижением внеклеточного пула триптофана, необходимого активно пролиферирующим клеткам. Фундаментальная система мониторинга питательных веществ любых клеток млекопитающих включает в

себя АМР-активируемую протеинкиназу (АМРК «отслеживает» уровень АТР в клетке), стресс-активируемую киназу-сенсор свободных аминокислот GCN2 («отслеживает» уровень свободных, не связанных с аминокислотами транспортных РНК), и мишень рапамицина млекопитающих mTOR (аккумулирует сигналы из различных источников и отвечает за баланс между ростом клетки и аутофагией) [212].

Исследования, проведенные на линиях HeLa и 3Т3 (Рис.3.), показали, что сигнал о дефиците триптофана активирует киназу GCN2, которая ингибирует фактор инициации трансляции эукариот 2а (eIF-2а), фосфорилируя его α субъединицу, что приводит к блокировке трансляции. Другой неустановленный сигнальный каскад блокирует mTOR, что снижает активность рибосомной протеинкиназы (S6K), блокирующей трансляцию, а также приводит к аутофагии за счет активации легкой цепи 3 белка, ассоциированного с микротрубочками, маркера аутофагии (LC3). Предложена гипотеза, согласно которой возможно участие триптофанил-тРНК-синтетаз WARS1 и WARS2 в качестве сенсоров триптофана, так как установлено, что лейцил-тРНК-синтетазы являются активирующими белками ГТФаз семейства RAS (Rag). Взаимодействие лейцил-тРНК-синтетазы, нагруженной аминокислотой, с гетеродимером RagB-GDP/RagD-GTP приводит к обмену фосфата за счет GTP-азной активности; активированный гетеродимер через RagB-GTP связывается с Raptor последовательностью mTORC1, что приводит к многократному возрастанию фосфорилирования и активации S6K (Рис. 3.) [107, 181].

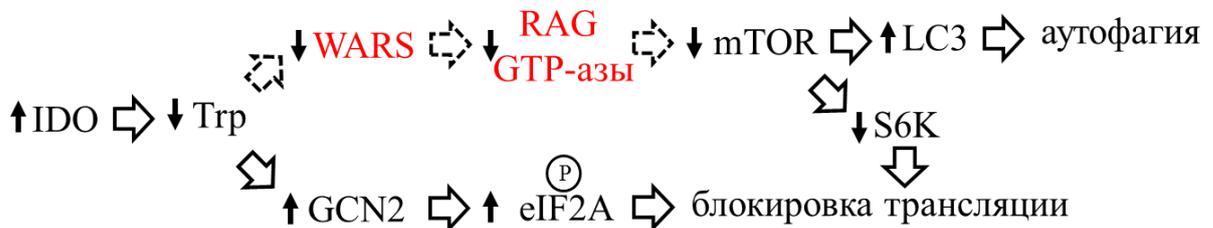


Рис. 3. Молекулярные механизмы действия IDO на клетки-мишени. Черным отмечены экспериментально подтвержденные данные, красным – предполагаемые участники.

Новые данные о том, что лейцил-тРНК-синтетаза может регулировать активность mTOR [107], позволяют предположить существование подобного механизма и для триптофанил-тРНК-синтетаз, который требует экспериментального доказательства. В то же время, *in vivo* выявлено, что именно IDO приводит к индукции GCN2 киназы в активированных Т-клетках и сигналу, вызывающему обратимую (с помощью экзогенного IL-2) анергию Т-клеток. При этом блокировка IDO с помощью ингибитора 1-метил-D,L-трип-

тофана (1-МТ) или использование Т-клеток с нокаутом GCN2 приводило к полному отсутствию иммуносупрессорного действия IDO [193]. Дальнейшие исследования показали, что сочетание низкого уровня триптофана и его метаболитов вызывало у активированных CD8 Т-клеток снижение уровня ξ цепи Т-клеточного рецептора (ТКР). Это снижение было непосредственно связано с активностью киназы GCN2. При этом у CD4 Т-клеток никаких изменений в составе и уровне синтеза ТКР зарегистрировано не было [78].

Сказанное не исключает, что, возможно, IDO индуцирует анергию Т-клеток за счет альтернативного механизма. Введение плазмиды, несущей полноразмерную кДНК IDO, в клеточные линии Т-лимфоцитов человека С1866 и МТ-2 значительно снижало уровень CD4 на поверхности этих клеток, причем добавление триптофана восстанавливало этот эффект лишь частично [113].

Для детальной характеристики механизма иммуносупрессии, вызванной IDO в Т-клетках, необходимы дополнительные экспериментальные доказательства. В частности, данные о том, каким образом происходит запуск синтеза IDO в МСК являются важными для моделирования иммуносупрессорных свойств МСК *in vitro*.

Считается, что экспрессия IDO в МСК находится под контролем цитокинов семейства интерферонов, в частности IFN- γ , так как блокировка рецептора IFN- γ на поверхности МСК значительно снижает иммуносупрессорный потенциал клеток. [61]. По-видимому, этот механизм не единственный, поскольку предварительная активация toll-подобных рецепторов (TLR) на поверхности МСК приводит к значительному увеличению иммуносупрессорного эффекта и появлению кинуренина в среде культивирования. Показано, что активация TLR-3 поли-инозиновой-поли-цитидиловой кислотой (poly(I:C)) инициирует транскрипцию IFN- β , который связывается с рецептором на поверхности МСК, приводя к индукции гена IDO [238].

В то же время, результаты ряда работ, в которых блокировка активности IDO в МСК человека, лишенных рецептора IFN- γ , не отменяла эффект иммуносупрессии, свидетельствуют о вероятном вкладе дополнительных растворимых факторов и молекулярных механизмов иммуносупрессии, опосредованной МСК [89].

4.4.2 Роль NO в иммуносупрессорном действии мышечных МСК на Т-клетки

Иммуносупрессорный потенциал мышечных МСК связан с активацией фермента индуцируемой NO-синтазы (iNOS) и продукцией реакционно способного оксида азота (II) NO,

синтез которого катализирует iNOS. Несмотря на существенный вклад iNOS и NO в иммуносупрессорную программу МСК мышцы, не исключено участие других растворимых факторов [226]. NO является низкомолекулярным регулятором клеточных процессов, в частности, он модулирует функции клеток иммунной системы. В физиологических условиях NO, продуцируемый клетками эндотелия, необходим для поддержания перистальтики лимфатических протоков, по которым в лимфатические узлы попадают дендритные клетки для презентации антигенов [154]. При воспалении iNOS миелоидных клеток вырабатывает NO в существенно больших количествах, чем в норме, прерывая сигнальный путь, способствующий сокращению стенок лимфатических сосудов. В итоге дендритные клетки не доходят до лимфатических узлов, что препятствует активации лимфоцитов [248].

Раньше полагали, что основное иммуносупрессорное действие NO связано с индукцией митохондриального апоптотического каскада в клетках-мишенях. Считается, что, попадая в клетку, NO, начиная с концентраций в 1мМ [296], способен активировать протеинкиназы, которые фосфорилируют транскрипционный фактор-супрессор опухоли (p53), препятствуя деградации и способствуя его активации, что приводит к индукции апоптоза. [33] Также на линии SH-SY5Y нейробластомы человека было установлено, что, начиная с концентраций 250 мкМ NO сильно снижает выживаемость популяции за счет стимуляции выхода цитохрома с из митохондрий с последующей активацией специализированных проапоптотических каспаз, в частности каспазы-3 [302].

В малых дозах NO не всегда индуцирует апоптоз, а может блокировать пролиферацию иммунных клеток. При сокультивировании мышечных МСК с Т-лимфоцитами наблюдали снижение пролиферации, коррелирующее со снижением фосфорилирования передатчика сигнала и активатора транскрипции 5 (STAT5), ответственного за экспрессию гена IL-2 в Т-клетках. Ингибирующий эффект МСК был значительно сильнее в условиях, когда клетки МСК могли контактировать с лимфоцитами. Добавление ингибитора iNOS в среду устраняло вышеописанный эффект NO на Т-клетки. [246]. Существует прямая корреляция между снижением фосфорилирования тирозиновых остатков в сигнальном пути Jak3-STAT5 и супрессией пролиферации. В смешанных культурах МСК и Т-клеток блокировка синтеза NO приводила к восстановлению фосфорилирования STAT5 и, соответственно, потере ингибирования пролиферации Т-клеток [27]. Возможный механизм заключается в

образовании пероксинитрита в результате взаимодействия NO с O_2^- , что приводит к нитрозилированию тирозинов в составе сигнальных киназ, блокирующему их фосфорилирование и, как следствие, способность передавать сигнал [137, 214].

В клетках Т-лимфомы мышей NO (в концентрации до 1мМ) блокирует экспрессию гена IL-2, запускаемую IL-1 β , и не приводит при этом к апоптозу, если цитокин добавлен в момент начала стимуляции клеток. Причина - в действии NO на ДНК связывающий фактор белок специфичности 1 (Sp1), имеющий в своем составе домен - цинковый палец. Нитрозилирование цистеиновых остатков приводит к высвобождению Zn^{2+} и дестабилизации ДНК-связывающего домена [25]. Установлено, что NO значительно увеличивает уровень свободного цинка в клетке, особенно в ядре [24]. Однако NO взаимодействует только со свободными транскрипционными факторами, не связанными с ДНК. В промоторе IL-2 существуют сайты связывания двух таких транскрипционных факторов: специфического белка 1 (Sp1) и EGR-1(фактора ответа раннего роста 1). Таким образом, отсутствие связывающих цинк транскрипционных кофакторов, инициирующих посадку полимеразного комплекса, приводит к нарушению экспрессии гена IL-2 (Рис. 4). [25].

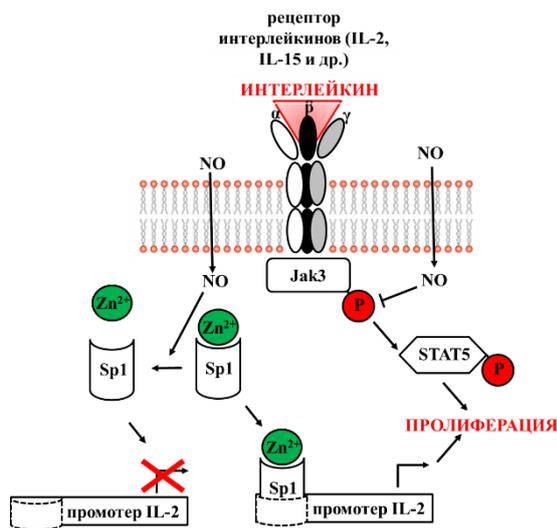


Рис. 4. Предполагаемые механизмы ингибирования пролиферации лимфоцитов под действием NO, связанные с активностью IL-2.

Благодаря своим физико-химическим свойствам NO, очевидно, не может обладать высокой специфичностью при связывании потенциальных мишеней. Поэтому идентификация белков, подверженных модификации при связывании NO и которые связаны с анергией Т-клеток, является непростой, но очень важной задачей. NO взаимодействует с тиоловыми группами белков, влияя на их функциональную активность. Например, было показано, что активированные Т-клетки для нормальной пролиферации должны поддерживать определенное соотношение свободного глутатиона к окисленному. В случае нарушения этого соотношения происходит арест клеточного цикла в G1/S стадии [180]. Обнаружено, что увеличение уровня NO, действующего на Т-клетки, коррелирует со снижением в них концентрации свободного глутатиона. Таким образом, существует вероятность индукции анергии лимфоцитов с помощью NO через снижение свободного глутатиона [286].

Для индукции iNOS необходимы TNF- α , IL-1 α , IL-1 β . Причём в одних работах утверждается, что иммуносупрессорный эффект сильнее выражен в контактных условиях взаимодействия между клетками, в других – в бесконтактных [226, 246]. Также последние исследования продемонстрировали, что экспрессия NOS2 в МСК находится под контролем супрессора сигнального пути цитокинов 1 (SOCS1), так как в случае его блокировки наблюдалось резкое увеличение уровня iNOS и секреции NO. Также пониженный уровень SOCS1 был зарегистрирован в МСК пациентов, страдающих ревматоидным артритом, что вероятно свидетельствует о патогенной роли NO в воспалительных заболеваниях суставов [307, с. 1].

Исследования иммуносупрессорной программы МСК показывают, что, как и в случае с IDO, влияние NO распространяется на все клетки иммунитета, а не только на Т-лимфоциты. Возможно, именно поэтому, он является доминантной эффекторной иммуносупрессорной молекулой в мышечных МСК.

4.4.3 Роль дополнительных растворимых факторов в бесконтактной иммуносупрессии МСК

Список молекул-кандидатов бесконтактной иммуносупрессии, опосредованной МСК, постоянно пополняется. На данный момент известен целый ряд дополнительных факторов, участвующих в иммуносупрессии, среди них: фактор роста опухоли β (TGF- β), простагландин E2 (PGE2), стимулированный TNF- α ген 6 (TSG-6), галектины и человеческий лейкоцитарный антиген 1 типа (HLA-G) [10, 65, 161, 230]. Обнаружение этих факторов усложняет наши представления о реализации бесконтактной иммуносупрессорной программы МСК, однако большинство исследователей сходится на мнении, что все же эти факторы играют скорее вспомогательную функцию в иммуносупрессии.

TGF- β - полипептид из 112 аминокислотных остатков, секретируется тромбоцитами, макрофагами, лимфоцитами, фибробластами, МСК, эпителиальными и дендритными клетками в ответ на действие IFN- γ [199]. TGF- β широко известен своим участием в воспалительных процессах: способствует миграции фибробластов в очаг повреждения, регулирует перестройку коллагена, а также связан с сигнальными путями, запускающими воспаление [67, 81, 287]. Известно, что TGF- β негативно влияет на активацию Т-лимфоцитов. Сигнал от TGF- β ингибирует ген IL-2, который содержит сайты связывания Smad2/3. У дефицитных по TGF- β или его рецептору мышей происходит спонтанная пролиферация

и инвазия Т-клеток, (по крайней мере для CD8 Т-клеток, которые превращаются в цитотоксические лимфоциты), что приводит к летальному исходу в раннем возрасте [149]. Большинство исследователей считают, что в иммуносупрессорной программе МСК TGF- β , скорее всего, играет вспомогательную роль. Однако исследование МСК из пульпы зуба показало, что эти клетки осуществляют супрессию активированной тотальной популяции ЛПК только за счет действия TGF- β , так как добавление ингибиторов IDO, PGE2 и iNOS к блокировке иммуносупрессии не приводило [65].

Простагландин E2 (PGE2) относится к классу эйкозаноидов. Было показано значительное увеличение PGE2 в условиях сокультивирования МСК с активированными фитогемагглютинином лимфоцитами, которое прямо коррелировало с эффектом иммуносупрессии, при этом в контактных условиях эффект иммуносупрессии был сильнее. При добавлении ингибитора циклооксигеназы 2 (COX2), индометацина (ингибирует скорость-лимитирующую стадию синтеза PGE2) пролиферация ЛФ восстанавливалась более чем до половины исходного уровня [10]. Помимо общего в отношении всех активированных Т-клеток негативного эффекта, PGE2, секретируемый МСК, вероятно, играет важную специфическую роль в снижении активности субпопуляции Т-хелперов 17. При сокультивировании этих лимфоцитов с МСК костного мозга в бесконтактных условиях не наблюдали снижения уровня триптофана или увеличения количества NO в среде, а блокировка активности IDO или iNOS на иммуносупрессию не влияла [93]

Стимулированный TNF- α ген 6 (TSG-6) - это мультифункциональный белок, участвующий в воспалении, формировании внеклеточного матрикса, клеточной миграции и развитии. Показано, что секретируемый мышинными МСК TSG-6, блокирует созревание ДК путем снижения экспрессии CD80, CD86, МНС-II и кластера дифференцировки 11 (CD11), что препятствует активации антиген-специфических Т-клеток [161, 168]. На модели инфаркта миокарда мышей показано, что введенные внутривенно человеческие МСК продуцировали большое количество TSG-6, и, несмотря на накопление МСК в легких, происходило значительное системное снижение симптомов воспаления. Если же в МСК подавляли продукцию TSG-6, позитивный терапевтический эффект пропадал. [145]. Интересно, что большое количество МСК, секретирующих TSG-6 обнаруживают в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом [182].

Галектины – это лектины, принадлежащие к семейству связывающих β -галактозидов, которые присутствуют на поверхности активированных Т- и В-клеток, а также макрофагов [219]. Они могут существовать в мембранной и секреторируемой формах. Среди галектинов есть стимулирующие и ингибирующие пролиферацию и активацию Т-клеток белки, в особенности галектины 1, 9, 3 [218].

Было обнаружено, что взаимодействие МСК с лигандами рецепторов TLR-2 и NOD1 (белок, содержащий олигомеризующий нуклеотидсвязывающий домен 1), приводило к индукции ряда генов, в том числе, галектина-3. Выключение этого гена приводило к снижению иммуносупрессирующего эффекта МСК [257].

Помимо галектина-3, транскрипция гена галектина-1 и трансляция его мРНК сильно повышаются в МСК во время инкубации со смешанной культурой лимфоцитов. При этом происходит снижение секреции провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, а также супрессия пролиферации Т-хелперов 1 типа. Выключение гена галектина-1 с помощью миРНК в МСК предотвращает перечисленные выше эффекты [95].

Помимо галектинов -1 и -3 было показано, что супрессорным действием в секретоме МСК обладает и галектин-9, который ингибировал пролиферацию как В-, так и Т-клеток в системе инкубации человеческих МСК со смешанной культурой лимфоцитов [283].

HLA-G является неканоническим человеческим лейкоцитарным антигеном 1 типа, который синтезируется в растворимой и мембраносвязанной форме [114]. HLA-G был обнаружен в трофобластах щеточной каемки человека. Эти клетки *in vitro* модулировали активность натуральных киллеров (НК) и снижали их цитолитическую функцию в составе ЛПК пуповинной крови человека. Таким образом, как полагают исследователи, происходит защита эмбриона от лизиса со стороны НК клеток иммунной системы матери [233]. Однако дальнейшие исследования отчетливо показали, что HLA-G принимает участие в регуляции врожденного и приобретенного иммунитета и в случае опосредованной МСК иммунорегуляции [40]. Также установлено, что при сокультивировании активированных ФГА ЛПК с МСК у последних падала иммуносупрессорная функция при добавлении блокирующих антител на HLA-G. Однако полного восстановления пролиферации лимфоцитов не наблюдали, что свидетельствует о действии других факторов. [230].

4.4.4 Везикулярный транспорт МСК как механизм кооперативного действия растворимых иммуносупрессорных факторов

Последние данные позволяют предположить, что комбинированное действие растворимых факторов иммуносупрессии может быть связано с их совместной транспортировкой к клеткам-мишеням в везикулах. Тем более, что установлено участие везикул, секретлируемых МСК, в регенеративных процессах [35]. Подтверждено экспериментально, что МСК передают клеткам-реципиентам везикулы, содержащие различные мРНК, которые должны влиять на функционирование клеток-мишеней [34]. Так в везикулах обнаружены мРНК факторов транскрипции ретинобластомоподобного белка 1 (RBL1) и малого убиквитин-подобного модулятора (SUMO), участвующие в пролиферации, а также ростового фактора HGF [71].

Помимо мРНК, везикулы могут доставлять и белки - факторы иммунорегуляции. Анализ везикул мышечных МСК, активированных IL-1, выявил наличие в них PD-L1, TGF- β и галектина 1. При этом для достижения эффекта везикула, по всей вероятности, должна быть интернализирована внутрь клеток-мишеней, так как блокировка молекул адгезии на поверхности везикул, способствующих ее интернализации, существенно снижала наблюдаемый эффект [185]. Получены экспериментальные доказательства влияния везикул, секретлируемых МСК, на активность иммунных клеток. Добавление фракции везикул от МСК к ЛПК, полученных от пациентов, страдающих диабетом I типа, приводило к снижению IFN- γ в среде, а также увеличивало уровень PGE2 и TGF- β , что, вероятно, свидетельствует об увеличении пропорции Т-регуляторных клеток в тотальной популяции. Также исследователи обнаружили снижение процента Т-хелперов 17 типа среди CD4 лимфоцитов. Важно отметить, что везикулы были получены из МСК, не подвергавшихся активации [80].

Изучение везикулярного транспорта МСК довольно молодое направление [1, 242], однако, уже есть данные о позитивном влиянии везикул от МСК на приживление трансплантата в модели GvHD. Введение везикул, полученных от активированных МСК, под кожу мышам, заблокировало развитие реакции GvHD на 2 дня по сравнению с контрольной группой [306].

Таким образом, благодаря исследованиям везикул, продуцируемых МСК, гипотеза о кооперативности растворимых факторов получает новое развитие, так как если раньше

считали, что все факторы, такие как: IDO, NO, TGF- β , PGE2 и другие, секретируются просто во внеклеточное пространство, сейчас полагают, что те из них, которые действуют синергично, могут быть доставлены к клеткам-мишеням внутри везикул [36], например TGF- β и HGF, но эти гипотезы требуют дальнейших экспериментальных подтверждений.

4.4.5 МСК блокируют активность Т-клеток при аутоиммунных заболеваниях

Для подтверждения терапевтической значимости механизмов иммуносупрессорного влияния МСК на Т-клетки активно применяют животные модели аутоиммунных заболеваний. Наиболее распространенными из них являются: ЭАЭ грызунов, который похож на рассеянный склероз человека; индуцированный коллагеном ревматоидный артрит, аллергическое воспаление дыхательных путей, моделирующее развитие астмы, и индуцированный экспериментальный язвенный колит, моделирующий условия болезни Крона. Для всех выше описанных моделей показаны и подтверждены терапевтические эффекты МСК.

Рассеянный склероз (РС) - это хроническое аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (ЦНС). Основными признаками РС являются демиелинизация нервных волокон, гибель олигодендроцитов и массивное проникновение в участки демиелинизации активированных лимфоцитов и макрофагов [163]. Индукторами РС являются аутореактивные Т-клетки, которые узнают основной белок миелина (МВР) и миелиновый протеолипидный белок (PLP), α B-кристаллин, нейрофасцин и инициируют атаку против них [50, 263]. Также при РС активно пролиферируют клетки памяти с фенотипом CD4CD45RO (тирозин-фосфатазный рецептор типа C), которые циркулируют в кровяном русле и активно секретируют IL-17. Данный цитокин приводит к повышенной активации макрофагов и паренхимных клеток, что приводит к еще большему повреждению нервных волокон [84, 303]. На модели ЭАЭ показано, что введение МСК значительно снижает уровень демиелинизации у мышей, коррелировавший с пониженной инвазией Т-клеток и макрофагов в ЦНС. Полагают, что это связано с индукцией у Т-лимфоцитов обратимой анергии, вызванной действием МСК, так как выделенные из мышей лимфоциты не отвечали на ре-стимуляцию ни с помощью индуктора ЭАЭ (MOG35-55), ни с помощью митогена конкавалина А, ни с помощью антител к CD3 и CD28. Однако пролиферативную способность удавалось восстановить, добавляя к культуре Т-клеток IL-2. Также было установлено, что флуоресцентно меченые МСК после введения попадали в селезенку и лимфатические узлы непосредственно в зоны локализации Т-клеток. [305].

Ревматоидный артрит (РА) – это аутоиммунное заболевание, в патогенезе которого доказана роль Т-лимфоцитов (как CD4, так и CD8) [126, 205]. Принято считать, что коллаген II типа, входящий в состав гиалинового хряща, является одной из основных причин возникновения этого заболевания [132], так как часть его белковой структуры, по невыясненным причинам, узнается Т-лимфоцитами, которые в свою очередь, активируясь, секретуют воспалительные цитокины IFN- γ ; TNF- α [86, 241]. Это приводит к активации резидентных макрофагов синовиальной жидкости, которые начинают продуцировать воспалительные цитокины IL-1, IL-6, TNF- α . Под действием цитокинового окружения синовиальные фибробласты начинают секретировать матриксные металлопротеиназы [86]. В результате развивается бесконтрольный иммунный ответ, разрушающий ткани хрящей суставов и позвоночника [290]. На модели РА у мышей, иммунизированных куриным коллагеном II типа, было показано, что одноразовое введение МСК жировой ткани человека на начальных этапах развития заболевания приводило к 100% выздоровлению животных. По предположению исследователей, терапевтический эффект связан с направленным действием МСК на субпопуляции Т-хелперов 1 и 17 типов. Анализ Т-хелперов 1 и 17 показал значительное снижение их пролиферативной способности, а также уменьшение секреции IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17. Также установлено, что МСК не влияют на активность или пролиферацию противовоспалительных Т хелперов 2 типа [97].

Активное участие Т-клеток подтверждено в развитии астмы, которая характеризуется патологическим хроническим воспалением, обильным выделением бронхиальной слизи, а также при тяжелых формах фиброза легких [139]. Предполагают, что астму индуцируют Т-хелперы 2 типа [55, 165], которые продуцируют определенный набор воспалительных цитокинов, среди которых наибольший вклад в развитие патологии вносят IL-13 и IL-9. На экспериментальной модели аллергического воспаления дыхательных путей, индуцированного ОВА, у мышей исследователи продемонстрировали, что введение МСК жировой ткани значительно снижало симптомы астмы, такие как гиперреактивность дыхательных путей, накопление воспалительного инфильтрата в легких (в особенности эозинофилов), продукция слизи. МСК значительно снижали активность Th2, негативно влияя на продукцию IL-4. Полученные данные коррелируют со сниженным содержанием IL-5 и TGF- β , что указывает на редукцию секреторной функции эозинофилов, которая, вероятно, зависит от активности Th2. [204].

Болезнь Крона - это воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта, этиология которого неясна, однако очевидно, что целый комплекс факторов провоцирует развитие заболевания. Клинические проявления зависят от степени развития патологии – в самых тяжелых случаях наблюдается кишечное кровотечение, диаррея, потеря веса, боли в брюшной полости [210]. В последнее время, благодаря активному развитию животных моделей этого заболевания, доказано участие Т-клеток в частности, Th1, в развитии болезни Крона [89]. После активации в зоне соединительной ткани lamina propria слизистой оболочки ЖКТ, расположенной под слоем эпителия слизистой и состоящей из рыхлой соединительной ткани с железами и лимфоидными образованиями [284], патогенами, продуцируемыми бактериальной микрофлорой кишечника, Т-клетки активируют макрофаги, которые продуцируют спектр воспалительных цитокинов, среди которых, IL-12, IL-23. Эти факторы поддерживают дополнительную активацию Т-клеток, что способствует повышенной секреции лимфоцитами воспалительных IFN- γ и TNF- α и приводит бесконтрольному системному иммунному ответу [206, 300]. Болезнь Крона активно изучают в мышинных моделях с целью установления механизма и оптимизации протокола лечения с использованием МСК. В 2009 году были представлены результаты [57] изучения иммуносупрессорных свойств МСК, полученных из десны человека, в модели болезни Крона. Использовали мышь с индуцированным декстран сульфатом язвенным колитом (условия, приближенные к болезни Крона). Продемонстрирована иммуносупрессорная активность МСК *in vitro*, и обнаружено, что введение МСК десны в мышей с индуцированным колитом значительно снижает миграцию CD4 Т-лимфоцитов в зону поражения. Также зарегистрировали снижение секреции воспалительных цитокинов в слизистой оболочке и расположенных под ней тканях, при этом уровень противовоспалительного IL-10 в зоне повреждения значительно возрос.

Таким образом, анализируя данные, полученные на различных моделях заболеваний, можно предположить, что МСК обладают целым рядом инструментов для контроля иммунных клеток, в первую очередь Т-лимфоцитов. Вопрос о механизмах иммуносупрессии МСК активно изучается. Однако большое количество противоречивых данных мешает исследователем увидеть полную и ясную картину взаимодействия между МСК и Т-клетками. Многократно показано, что МСК осуществляют свою иммуносупрессорную деятельность за счет растворимых факторов, среди них наиболее часто регистрируют IDO, PGE2, IL-10, HGF, NO [90]. Однако при наличии контактных взаимодействий между МСК

и отдельными субпопуляциями ЛФ или других участников иммунного ответа, по-видимому, запускаются дополнительные механизмы, которые могут усиливать иммуносупрессию, вызванную растворимыми факторами [253]. При этом место контактных механизмов в иммуносупрессорной программе до сих пор не определено: они могут являться как частью общей иммуносупрессорной программы, так и отдельной «веткой» иммуносупрессии.

4.4 Контактные взаимодействия между МСК и Т-лимфоцитами

В рамках изучения иммуносупрессорной деятельности МСК была показана важность секреторных механизмов. Однако добавление к МСК облученной тотальной популяции ЛПК в контактных условиях усиливало секреторную активность МСК и увеличивало иммуносупрессорный эффект на лимфоциты-респонденты, которые не имели прямых контактов с МСК. Эти данные позволили говорить о влиянии контактных взаимодействий на бесконтактную составляющую иммуносупрессорной программы МСК [281]. Впоследствии неоднократно было подтверждено, что комбинированное взаимодействие растворимых факторов и контактных взаимодействий дает максимальный эффект иммуносупрессии (90% снижения пролиферации активированных Т-клеток, инкубируемых с МСК контактным способом, против 70% в отсутствие контактов между МСК и лимфоцитами) [64, 105, 138, 228]. На тот момент, благодаря фенотипической характеристике МСК, было известно, что они несут на своей поверхности молекулы адгезии, среди них: ICAM, VCAM, LFA-3 (ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген 3), МНС-I, что, возможно, связано с их иммунорегулирующими свойствами, наблюдаемыми в моделях заболеваний [60, 208]. Особенно важно это по-видимому для МСК костномозгового происхождения, которые формируют микроокружение, контролирующее развитие клеток иммунной системы [98, 278]. Помимо этого, известны данные о миграции МСК в лимфатические узлы при системном введении животным. Эти факты позволяют предположить, что молекулы адгезии и другие типы молекул на мембране МСК, обеспечивающие контакты между клетками, могут играть важную роль в их направленной миграции (хоуминге) и взаимодействии с Т-клетками.

4.4.1 Участие молекул адгезии в хоуминге МСК

На сегодняшний день известно, что в механизме хоуминга МСК могут участвовать как рецепторы к хемокинам, так и иммуномодулирующие рецепторы, в частности TLR [67, 177]. После того, как МСК по сосудистому руслу мигрировали в зону активированного

воспалением эндотелия по градиенту концентрации, им необходимо проникнуть в сам очаг повреждения. Считают, что МСК могут использовать те же механизмы, что и лейкоциты. Как известно, в результате повреждения воспалительные факторы связываются с клетками эндотелия близлежащих участков и способствуют увеличению уровня селектинов на поверхности клеток эндотелия (активация эндотелия). В результате взаимодействия МСК с селектинами происходит постепенное снижение скорости движения МСК в кровяном русле. Известно, что для хоуминга клеток, например в костный мозг, необходима гликозилированная форма CD44 (лиганд E/L селектинов гематопозитических клеток) [239]. На сегодняшний момент на поверхности МСК был обнаружен CD44 [240]. На следующем этапе происходит активация остановившихся МСК за счет взаимодействия рецепторов, связанных с G-белками, и лигандами, секретируемыми клетками эндотелия. Большинство работ подтверждает важную роль взаимодействия рецептора CXCR4 на поверхности МСК с лигандом SDF-1 (фактор стромальных клеток 1) [252, 299]. Показано, что обе эти молекулы необходимы для реализации механизмов хоуминга в костный мозг [187]. За счет образования комплекса рецептор-лиганд происходит более прочное взаимодействие между МСК и клетками эндотелия. На этой стадии предполагают активное участие интегринов. Было показано, что для хоуминга МСК крайне важен интегрин $\beta 1$, так как его блокировка прекращает хоуминг МСК [118]. Для взаимодействия с молекулами адгезии интегрин должны формировать димеры. Интегрины $\alpha 4$ и $\beta 1$ формируют димер VLA-4 (очень поздний антиген 4) на поверхности МСК, который, в свою очередь, взаимодействует с молекулой адгезии VCAM-1 на поверхности эндотелия. Воспалительные цитокины (TNF- α) усиливают адгезию МСК на эндотелии [236, 249]. Наконец, независимо от механизмов, МСК попадают в очаг повреждения, где взаимодействуют с клетками иммунной системы, в первую очередь, лимфоцитами.

4.4.2 Участие контактных механизмов в иммуносупрессии лимфоцитов с помощью МСК

Принято считать, что индукция спонтанного апоптоза, а также анергия Т-лимфоцитов, особенно хелперов, зависят от контактных взаимодействий между клетками. На поверхности МСК человека в больших количествах экспонирован белок В7-Н4 (ингибитор активации Т-клеток 1), блокировка которого специфическими антителами значительно, но не полностью снижает иммуносупрессорное влияние МСК на Т-клетки, активированные ФГА. Механизм действия В7-Н4 на Т-клетки связан с ингибированием транслокации NF-

кВ, одного из основных факторов транскрипции, необходимых для активации лимфоцитов, в ядро, что приводит к аресту Т-клеточного цикла в G0/G1 фазе [301]

Контактные взаимодействия важны и для иммуносупрессии, осуществляемой мышинными МСК. В условиях воспалительного микроокружения МСК многократно увеличивают количество поверхностных молекул ICAM-1 и VCAM-1 (Рис. 5.), а также секрецию многочисленных хемоаттрактантов для лимфоцитов [228].

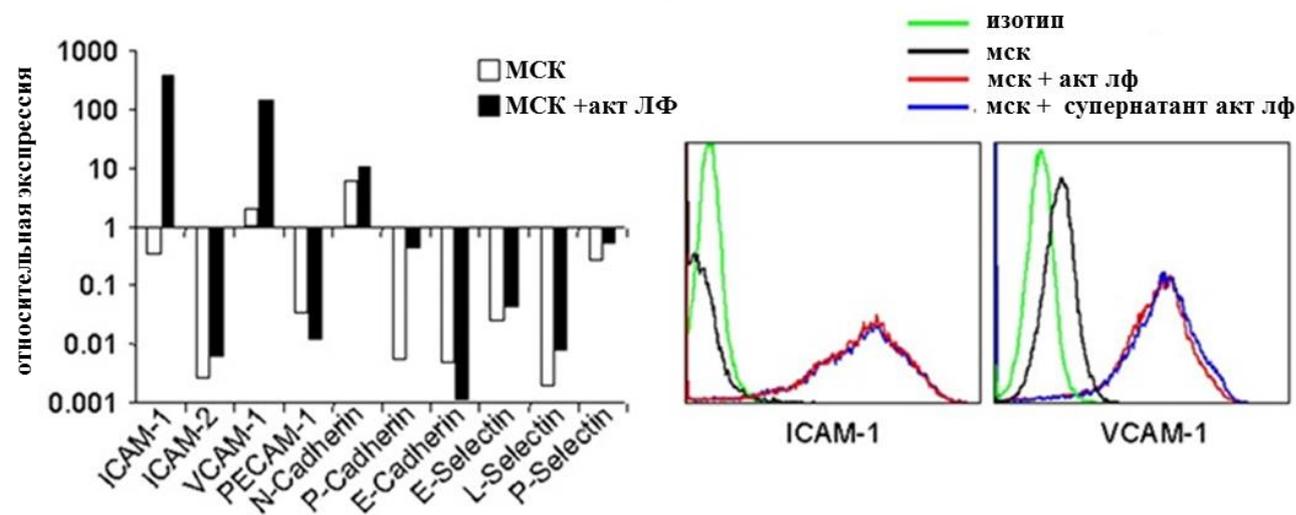


Рис. 5. Оценка уровня молекул адгезии на поверхности мышинных МСК после инкубации с активированными лимфоцитами селезенки мыши в течение 48 часов; адаптировано из [228].

Дальнейшие эксперименты показали, что индукция ICAM-1 и VCAM-1 вызывается в МСК под действием комбинации IFN- γ и TNF- α . Кроме этого, МСК, лишённые ICAM-1 в результате нокаута гена, обладают пониженной иммуносупрессорной способностью по отношению к лимфоцитам [228]. Недавно было показано, что мышинные МСК с искусственно увеличенной экспрессией гена ICAM-1 обладают повышенными иммуносупрессорными свойствами. Они более эффективно подавляют пролиферацию Т-клеток *in vitro* в смешанной культуре лимфоцитов, по сравнению с МСК дикого типа. Введение таких модифицированных МСК в мышей-реципиентов с индуцированным GvHD показало, что сверхпродуцирующие ICAM-1 МСК эффективнее мигрируют во вторичные лимфоидные органы, где подавляют дифференцировку наивных Т-клеток в Th1 фенотип и способствуют индукции Treg фенотипа, по сравнению с МСК дикого типа. Несмотря на то, что молекулярный механизм, который обуславливает наблюдаемые эффекты, связанные с ICAM-1, изучен не был, эти результаты подтверждают важность этой молекулы для иммуносупрессии [269].

Также для мышинных МСК доказана ключевая роль контактных взаимодействий с участием взаимодействий рецептор/лиганд PD-1/PD-L1. В частности, при изучении иммуносупрессорного влияния МСК на Th17 лимфоциты *in vitro* показано, что контактные взаимодействия играют важную роль во влиянии на зрелые Th17. Комбинация IL-17 и TNF- α приводит к повышенной экспрессии у МСК PD-L1. Известно, что и активированные зрелые Т-клетки, и начинающие дифференцировку лимфоциты несут на своей поверхности рецептор PD-1, обеспечивающий контроль над активацией лимфоцитов и защищающий от спонтанной активации [157]. В случае зрелых Th17 МСК осуществляют выключение молекулярной программы лимфоцитов с помощью взаимодействия PD-L1/PD-1. Использование блокирующих антител либо против PD-L1, либо PD-1 значительно снижает иммуносупрессорный потенциал МСК. Блокировка не приводит к существенным изменениям в случае наивных Т-хелперов. Также в данной работе оценили иммуносупрессорную активность МСК по отношению к Th1. Показано, что механизм PD-L1/PD-1 в случае иммуносупрессорной программы МСК по отношению к Th1, большой роли не играет, что, дополнительно подтверждает специфичность действия МСК на различными субпопуляциями Т-хелперов [167].

Контактные механизмы выявлены и в случае иммуносупрессии, осуществляемой МСК человека. Введение аллогенных МСК пациентам, страдающим системным склерозом, приводит к значительному снижению уровня CD4 лимфоцитов уже через 6 часов после введения. Анализ МСК пациентов и здоровых доноров выявил, что МСК пациентов не способны нести на поверхности FasL, Fas и MCP-1. Известно, что активированные лимфоциты несут на своей поверхности рецептор Fas, который при связывании со своим лигандом FasL запускает апоптоз в лимфоцитах. При этом Fas в МСК контролирует секрецию хемоаттрактанта MCP-1, который необходим для привлечения лимфоцитов к МСК. [12]. В данной работе эту гипотезу предварительно проверили на мышах с использованием моделей системного склероза и острого колита.

Резюмируя имеющиеся данные по контактным механизмам иммуносупрессии, можно говорить о том, что они, по всей видимости, видоспецифичны. Помимо этого, существуют отдельные механизмы, направленные на конкретные популяции Т-клеток, что было продемонстрировано на примере Th17. Важно отметить, что контактные взаимодействия также играют роль и для реализации иммуносупрессии МСК в отношении других типов иммунных клеток, таких как В-лимфоциты и клетки врожденного иммунитета.

4.5 МСК подавляют функции В-клеток

МСК способны влиять на активность В-клеток при совместной инкубации путем ареста клеточного цикла в G0/G1 фазе, причем ряд исследователей говорит о необходимости контактных взаимодействий для реализации этого феномена, а другие опровергают этот факт [15, 247]. Также отмечено, что МСК способствуют понижению продукции иммуноглобулинов: IgM, IgG, и IgA В –клетками [53]. Также МСК влияют на дифференцировку В-клеток. Инкубация МСК с наивными В-клетками способствует их выживанию, однако добавление стимулирующих дифференцировку В-клеток агентов (СрG (олигонуклеотид, агонист TLR9), CD40L, IL-4, Ig) приводит к блокировке дифференцировки В-клеток в зрелые плазматические клетки, опосредуемой МСК [15, 268].

Исследования влияния МСК на В-клетки также проводили *in vivo*. На модели системной красной волчанки (СКВ) у мышей показано, что введение МСК больным животным значительно снижало продукцию IgG и IgM. [169]. С использованием модели ЭАЭ показано, что введение МСК не только блокирует функцию Т-клеток, но и значительно снижает уровень специфического IgG к индуктору заболевания PLP (пептиду 139-151 из протеолипида), что свидетельствует о подавлении активности В-клеток. [91].

Молекулярный механизм действия МСК на В-клетки изучен недостаточно. Наиболее подтвержденные механизмы рассмотрены ниже в таблице 1

Таблица 1

Предполагаемые механизмы влияния МСК на В-лимфоциты

Механизм	контакты	<i>in vivo</i>	Ссылки
IFN- γ \rightarrow МСК \rightarrow (PD-1/PD-L1) \rightarrow \downarrow пролиферация активированных В-клеток (\downarrow p-p38, p-Erk, p-Akt)	необходимы	-	[247]
МСК \rightarrow Galectin9 \rightarrow \downarrow пролиферация, \downarrow секреция IgG В-клетками	необходимы	мышь, иммунизированная человеческим рекомбинантным FVIII	[283]

Продолжение таблицы 1

Механизм	контакты	in vivo	Ссылки
МСК индуцируют Bregs (CD1d ^{high} CD5CD19 ^{high})	не установлено	мышь с индуцированным язвенным колитом	[45]
SDF1- α /CXCR7 \rightarrow МСК \rightarrow секреция IL-6,4,10, IFN- γ \rightarrow индукция Bregs	не важны		[217]
Примечание – расшифровки смотри в списке используемых сокращений			

Большинство исследований по изучению иммуносупрессорных свойств МСК проводились в основном с лимфоцитами в связи с их важностью в развитии аутоиммунных патологий. Однако, как известно, в хронических воспалительных процессах принимают активное участие и клетки врожденного иммунитета, такие как макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки.

4.6 Влияние МСК на клетки врожденного иммунитета.

Известно, что в большинстве случаев воспалительная реакция запускается клетками врожденного иммунитета. На сегодняшний день собрано большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о роли клеток врожденного иммунитета и в хроническом воспалении. Также было показано, что МСК способны оказывать иммунорегулирующий эффект на клетки врожденного иммунитета. Установлено иммуносупрессорное влияние МСК на дендритные клетки (ДК), макрофаги (МФ), нейтрофилы (НФ) и натуральные киллеры (НК).

ДК являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК), они фагоцитируют, переваривают чужеродный материал, а затем экспонируют его в виде небольших пептидов, связанных с комплексами гистосовместимости, которые могут узнаваться Т- и В-клеточными рецепторами, запуская иммунный ответ [85]. Таким образом ДК регулируют активацию Т- и В-клеток, а также натуральных киллеров [49, 72, 92]. Получены экспериментальные доказательства участия ДК в развитии хронических воспалительных процессов. В случае астмы было установлено, что ДК необходимы для активации и поддержания функционирования аллерген-специфичного ответа Т-хелперов 2 типа. [148]. Также исследователи установили важную роль CCL17-секретирующей популяция

ДК в развитии атеросклероза (CCL17 - С-С хемокин лиганд 17). Эта популяция активно привлекает в зону воспаления эффекторные Т-клетки и в то же время CCL17 блокирует активацию регуляторных Т-клеток [28]. Так как ДК способны активировать различные популяции Т-клеток (Th1 и Th2), они являются краеугольным камнем в развитии и поддержании ревматоидного артрита [245].

Макрофаги – это профессиональные фагоциты, которые, в зависимости от микроокружения, могут быть воспалительного M1, или противовоспалительного M2 фенотипа. [143]. Во время повреждения ткани фенотип макрофагов, которые присутствуют в эпицентре повреждения, будет определять длительность и силу воспалительного ответа. Взаимодействие макрофагов с IFN- γ в сочетании с бактериальными липополисахаридами или TNF- α приводит к активации M1-макрофагов [190]. Данный тип клеток секретирует: IL-8, IP-10, MIP-1 α , IL-1 β , IL-6 и TNF- α) [225, 261], а также является цитотоксическим. Токсичность проявляется в выбросе активных форм кислорода. В противовес M1-макрофагам основная задача M2-макрофагов (CD206⁺ - рецептор маннозы) – погасить воспаление и инициировать репаративные процессы. Их дифференцировка инициируется с помощью IL-4, IL-10, а также глюкокортикоидов. За счет секреции хемокинов (CCL18 и CCL17), они привлекают противовоспалительные типы моноцитов и Т-клеток, тем самым снижая воспалительный ответ. Отмечено активное участие макрофагов в хроническом воспалении. Например, в случае астмы аллерген связывается с макрофагами и запускает в них провоспалительную программу, которая реализуется через секрецию цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 и хемоаттрактантов для нейтрофилов и моноцитов (CCL2 CXCL1, и CXCL8). Далее МФ секретируют эластазы и протеазы, что приводит к ремоделированию альвеолярной стенки, а в дальнейшем к фиброзу [19]. Во время сепсиса часто наблюдают дисфункцию макрофагов, которая связана с пониженным поверхностным уровнем CD86 и HLA-DR [200].

Нейтрофилы (НФ) в ответ на патогены секретируют активные формы кислорода и бактерицидные факторы, одновременно они могут и фагоцитировать. НФ – короткоживущие клетки, при фагоцитозе они, как правило, погибают, усиливая воспаление за счет высвобождения провоспалительных факторов [166]. НФ участвуют в развитии воспаления, в том числе хронического, которое характерно для многих тяжелых заболеваний, напри-

мер, ревматоидного артрита (РА). В острой фазе РА нейтрофилы инициируют респираторные взрывы, генерируя АФК за счет многократного увеличения активности НАДФН оксидазы, продуцирующей большое количество супероксид радикалов [274].

Натуральные киллеры (НК) осуществляют уничтожение пораженных инфекцией или стрессированных клеток. НК атакуют клетки со сниженным уровнем МНС-I, являются основными участниками цитотоксического ответа на главный комплекс гистосовместимости и инициируют GvHD [235].

В связи с участием клеток врожденного иммунитета в патологических воспалительных процессах, предпринимаются попытки по расшифровке молекулярных механизмов взаимодействия МСК на клетки врожденного иммунитета. Эта область изучена еще довольно плохо и содержит много противоречивой информации. Наиболее подтвержденные данные по этому вопросу представлены в таблице 2.

Таблица 2

Предполагаемые механизмы иммуномодулирующего действия МСК на клетки врожденного иммунитета

–	механизм	кт	подтверждено in vivo	ссылки
	МСК → Galectin1 → ↓ активность ДК (↓CD80, CD86, МНС-II, ↓ p-p38 MAPK, ↑ p-Erk)	-		[308]
ДК	IFN γ → МСК → ↑iNOS → ДК (↓МНС-II)	-		[298]
	МСК → МСК → ↑PD-1 → ДК (↓CD86)	+		
	LPS → ДК → МСК → ↑ PD1+PGE2 → ДК(↓CD40)	+/-		
МФ	МСК+ГПК+LPS → МСК → ↑IL10 → ДКperCD11b ⁺ (↑p-STAT5, ↑p-STAT3 → ↑SOCS3)	+	иммунизация стопы мыши аллогенными спленоцитами	[160]
	МСК+ДК+LPS → МСК → ↑IL6 → ДКperCD11b ⁺ (↑p-STAT3 → ↑SOCS3, ↑ IL-10)	+		[62]

Продолжение таблицы 2

–	механизм	КТ	подтвер- ждено in vivo	ссылки
МФ	LPS/TLR4→MCK(↑MyD88) →↑PGE2→PGE2/EP2,EP4→MФ(↑ IL-10)	+	сепсис мыши	[198]
	LPS+MCK+M1→MCK→↑TSG- 6→M2(↑CD206)	+	мышь с инду- цированным (LPS) выкиды- шем	[151]
НФ	MCK→TSG-6→НФ (стим LPS) → НФ (↓ НЛ, АФК)	-		[170]
	MCK + НФ (предакт IL-8) → MCK →IL-6→ ↓апоптоз НФ (↑p-STAT3)	-		[220]
НК	MCK+НК+IL-2→MCK→↑IDO, PGE2→ НК(↓ IFN-γ, гранзим-B, пролиферация)	+		[260]
Примечание – КТ –наличие контактных взаимодействий, ГПК – гематопозитические про- генитрные клетки, MyD88 – ген первичного ответа миелоидной дифференцировки, НЛ – нейтрофильные ловушки,				

5. МСК участвуют в поддержании нормального функционирования иммунных клеток

Представляется маловероятным, что МСК являются исключительно иммуносупрессорами. Если рассматривать МСК в контексте тканевого микроокружения, то в нормальных физиологических условиях они, вероятно всего, способствуют выживанию лимфоцитов и других иммунных клеток в отсутствие стимуляции. Взаимодействие МСК со всеми типами иммунных клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета, а также способность МСК «переобучать» различные популяции клеток в регуляторные фенотипы, такие как M2 макрофаги, толерогенные ДК, регуляторные Т- и В-клетки - позволяет говорить о том, что МСК участвуют в контроле активности иммунной системы, а не в ее тотальном подавлении [195]. Существуют данные о поддержке МСК выживаемости наивных лимфоцитов и защите лимфоцитов от апоптоза в условиях депривации сыворотки

in vitro [23]. Исследования in vivo, проводимые в рамках применения МСК для лечения GvHD, показали, что одновременное введение МСК вместе с цитостатиками, например, циклоспорином приводит к ускоренному отторжению трансплантата, по сравнению с контрольной группой (крысы с трансплантированным сердцем без введения МСК) [111]. Активно обсуждается вопрос об участии не иммунных клеток и в частности МСК в защите от инфекций. На модели бактериального сепсиса у мышей было показано, что резидентные МСК во время начальных стадий заболевания наоборот способствуют привлечению нейтрофилов в очаг воспаления и стимулируют их фагоцитирующие функции, позволяя более эффективно бороться с бактериальной инфекцией [106]. Ниже будет рассмотрено взаимодействие МСК с различными типами иммунных клеток с точки зрения модуляции их активности, а не тотального подавления.

5.1 МСК модулируют активность дендритных клеток

Регуляция дифференцировки и функции дендритных клеток (ДК) является одним из ключевых моментов в действии МСК как на приобретенный, так и врожденный иммунитет. Циркулирующие ДК, нагруженные антигенными пептидами, мигрируя в лимфоидные органы, проходят через зону периваскулярного пространства, где находятся МСК [56]. Однако если раньше считалось, что МСК лишь подавляют функции ДК ингибируя их способность к презентации антигена и индуцируя толерогенный фенотип, то сейчас накоплено достаточное количество данных, свидетельствующих о том, что МСК модулируют активность ДК в зависимости от микроокружения и способны индуцировать также и воспалительный фенотип [69]. Механизм этого явления изучен недостаточно на данный момент. Наиболее подтвержденные факты представлены ниже в таблице 3.

Таблица 3

Модуляция активности ДК с помощью МСК

механизм	КТ	ССЫЛКИ
МСК _{восп+} наивные ДК ⁺ TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE2 \rightarrow зрелые ДК (\uparrow HLA-DR, CCR7, IL-27, IL-23)	+/-	[68]
LPS \rightarrow МСК \rightarrow \uparrow ВВ \rightarrow ДК (\uparrow презентация антигена Т-клеткам)	-	[221]
МСК _{восп-} – МСК, полученные из корневого канала зуба при апикальном периодонтите (воспаление вследствие инфекции), ВВ – внеклеточные везикулы		

Как видно из таблицы 3, вопрос о механизме действия на активацию ДК с помощью МСК не изучен до конца, однако, на основании данных *in vitro*, многие исследователи склонны считать, что МСК регулируют дифференцировку ДК в двух направлениях: если на МСК не действуют внешние воспалительные стимулы, то они будут ингибировать созревание ДК. Однако если же МСК *in vitro* инкубировать с патогеном, МСК, наоборот, стимулируют созревание и дифференцировку ДК [69].

5.2 МСК обеспечивают выживание наивных и активацию стимулированных в субоптимальных условиях Т-клеток

Известно, что МСК секретируют большое количество хемокинов для привлечения лимфоцитов, среди них CXCL9, CXCL10 и CXCL11. Последние экспериментальные данные позволяют предположить у МСК способность обеспечивать иммунную поддержку лимфоцитам в отсутствие сигналов выживания и пролиферации, или же стимулировать активацию лимфоцитов при наличии инфекции. Наиболее достоверные результаты по этой теме представлены в таблице 4.

Таблица 4

Иммунная поддержка лимфоцитов с помощью МСК

механизм	кт	<i>in vivo</i>	ссылки
МСК + наив ЛФ (предакт CD3, CD28 \leq 14 нг/мл) →↑пролиферация ЛФ			[150]
МСК iNOS ^{-/-} + наив ЛФ (предакт CD3) →↑↑пролиферация ЛФ		иммунизация мышей ОВА	
МСК+CD4 ЛФ + ФГА (5мкг/мл, IL-2 5нг/мл)→ МСК→↑IL-6, 1→↑ пролиферация Th17, ↓Th1	+		[103]
МСК + CD138 ⁺ B220 ⁻ ПК→ МСК→IL-6, CXCL12→ CXCL12/CXCR4 ПК (↑ IgG, IgM)	+		[127]
Примечание –наив – наивные, ПК – плазматические клетки			

Из таблицы 4 видно, что в условиях неоптимальной активации лимфоцитов, или инкубации с патогеном *in vitro* МСК способны поддерживать иммунный ответ, реализующийся через активацию различных популяций лимфоцитов.

5.3 МСК регулируют баланс между фенотипами макрофагов в зависимости от условий микроокружения и способствуют активации нейтрофилов

Было показано, что МСК способны регулировать переключение между M1 и M2 фенотипами макрофагов. [26]. Полагают, что в механизмах переключения участвуют как растворимые факторы, так и контактные взаимодействия между клетками. [73]. На модели сепсиса мышей, вызванной лигированием и пункцией слепой кишки, было продемонстрировано, что МСК костного мозга не снижали летальность у мышей, если у животных предварительно проводили элиминацию моноцитов и макрофагов. Авторы полагают, что МСК способствовали выживанию и активности макрофагов для борьбы с инфекцией [198]. На мышках, зараженных *E. coli*, было отмечено, что МСК усиливают фагоцитирующие функции клеток врожденного иммунитета – в первую очередь макрофагов [104]. В заключение стоит отметить, что, по-видимому, в условиях сепсиса МСК программируют макрофаги в альтернативном направлении, создавая новый фенотип с повышенной фагоцитирующей способностью и высоким уровнем синтеза IL-10 и IL-6, а также низким воспалительных IL-12 и TNF- α [73].

После запуска процесса воспаления макрофагами, секретируемые ими цитокины способствуют привлечению нейтрофилов [136]. Последние исследования позволяют говорить о способности МСК привлекать нейтрофилы в очаг воспаления. *In vitro* было продемонстрировано, что МСК человека, активированные липополисахаридами (10 нг/мл), активно продуцировали IL-6, IL-8, GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов) и MIF. Было установлено, что IL-8 и MIF способствуют активной миграции нейтрофилов. Также было отмечено, что нейтрофилы, культивируемые в кондиционной среде от МСК, активированных LPS выживали лучше за счет снижения спонтанного апоптоза в культуре [31].

5.4 МСК и презентация антигена

Еще одним механизмом, способствующим поддержанию клеток иммунитета с помощью МСК, предполагают презентацию антигена. Полученные данные в системах *in vitro* противоречивы. Однако предполагают, что МСК могут приобретать антигенпрезентирующие свойства в случае массивной инфекции. *In vitro* показано, что МСК могут иметь антигенпрезентирующие свойства на определенные виды патогенов (например, *S. albicans* и *T. toxoid*), при этом уровень синтеза HLA-DR на поверхности клеток поддерживается самими МСК за счет аутокринной секреции низких концентраций IFN- γ (10

мЕ/мл), при высоких концентрациях IFN- γ (100 мЕ/мл) и продолжительном инкубировании (более 12 часов) наблюдаемый эффект пропадает [44]. Таким образом, в случае проникновения патогена в среду организма, оказавшиеся рядом МСК могут стимулировать защитный иммунный ответ сами приобретая функции АПК и, возможно, стимулируя тем самым CD8 Т-клетки. Однако потом вероятно в условиях высоких концентраций IFN- γ программа МСК переключается на иммуносупрессию, так как постоянная презентация антигена может приводить к хроническому воспалительному процессу [44].

Резюме

Анализируя представленные выше данные, становится очевидно, что вопрос о механизмах иммуноподдерживающего действия на клетки иммунитета с помощью МСК требует дальнейшего изучения и стандартизации условий культивирования *in vitro*. Однако на данном этапе необходимо выявить ряд важных моментов.

В течение часов после начала развития воспаления молекулы, синтезируемые патогенами, или продуцируемые поврежденными тканями, узнаются рецепторами семейства TLR, находящимися на клетках врожденного иммунитета. Данное связывание рецептора с лигандом приводит к инициации фагоцитоза и высвобождению медиаторов воспаления, которые привлекают в очаг воспаления новые пулы нейтрофилов и макрофагов для борьбы с угрозой – это и есть первая линия неспецифической иммунной защиты [100]. Последние данные показали, что МСК несут TLR4, узнающие липополисахариды грамотрицательных бактерий, и TLR3, узнающие двухцепочечные РНК некоторых вирусов. Предполагают, что в зависимости от стимуляции того или иного TLR МСК способны поляризоваться либо в воспалительный МСК1 (активация TLR4), либо противовоспалительный МСК2 (активация TLR3) фенотипы. При специфической активации TLR3 МСК человека секретируют IL-6 IL-8, увеличивают уровень мРНК IDO и уровень секреции PGE2. Однако если специфически активировать TLR-4, то МСК секретируют воспалительные цитокины и хемоаттрактанты IL-4, IL-10, CCL10, CCL5 [297]. В дальнейшем было установлено, что долговременная стимуляция TLR способствует снижению уровня TLR4 и TLR2 на поверхности МСК, видимо, защищая организм от бесконтрольного развития воспалительного ответа [183].

Таким образом, данные *in vitro* и *in vivo* подтверждают взаимодействие МСК с клетками врожденного и приобретенного иммунитета. Это взаимодействие способствует по-

держанию баланса между уничтожением инфекционных агентов и инициацией репарации ткани, что предотвращает повреждения органов и сохраняет тканевой гомеостаз в норме.

6. Клинические исследования МСК

Показанная *in vitro* и подтвержденная *in vivo* иммуносупрессорная способность МСК побудила исследователей начать проведение клинических исследований по применению МСК для лечения аутоиммунных патологий. Однако, на данный момент вопрос об эффективности МСК в клинической практике остается открытым и требует дальнейшего тщательного изучения. При испытании МСК на пациентах, страдающих GvHD, показано, что введение МСК имеет позитивный эффект во время острой формы заболевания, но при хроническом GvHD введение аллогенных МСК менее эффективно - в одном исследовании только 5 пациентов из 11 имели позитивный исход [164]. При лечении РС с помощью МСК показано, что введение 10 пациентам аутологичных клеток в область позвоночного канала у 40% не приводило к функциональным улучшениям, а у 70% больных – к морфологическим. Данное исследование показало невысокую эффективность применения МСК самих пациентов в этом случае, а также необходимость дальнейших клинических испытаний, как с участием аутологичных, так и аллогенных МСК для лечения РС [184]. Схожим образом ситуация выглядит и с лечением СКВ. Были получены положительные результаты по применению аллогенных МСК костного мозга [153] и пуповины [265] на небольших выборках пациентов (15-16 человек), наблюдаемых в течение года после введения. Однако ученые из Китая провели большое испытание на 40 пациентах, страдающих тяжелой формой, трудно поддающейся лечению. Одноразовое введение аллогенных МСК пуповины показало, что несмотря на почти 90% индекс выживания пациентов, только треть из них демонстрировала признаки полного выздоровления в течение года; еще у трети наблюдали частичное улучшение состояния, а у остальных болезнь развилась снова в период 9-12 месяцев после инъекции МСК [294].

Заключение обзора литературы

Несмотря на активное изучение физиологии МСК и их участия в регенерации тканей, до сих пор не полностью расшифрована молекулярная программа иммунорегуляции. В первую очередь, из-за большого количества противоречивых данных неясно, каким образом МСК осуществляют иммунный надзор над участниками воспалительного ответа и контролируют баланс между физиологической нормой и воспалением [7, 236].

Введение МСК не всегда приводит к позитивному терапевтическому эффекту. Помимо экспериментальных моделей об этом свидетельствуют клинические данные [158, 176]. Таким образом, пока не будут сняты все разногласия, полученные в ходе клинических исследований и исследований *in vivo*, применение МСК, как терапевтического инструмента, в практику не пойдет. Для этого параллельно с исследованиями *in vivo* необходимо дальше расшифровывать механизмы молекулярной программы иммунорегуляции МСК, моделируя различные физиологические условия, раскладывая сложные многофакторные взаимодействия на отдельные составляющие в рамках *in vitro*.

В связи с этим, цель данной работы - установить механизмы иммунорегулирующего влияния мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека на лимфоциты (CD4 Т-хелперы) в культурах *in vitro*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить, как мезенхимные стромальные клетки влияют на лимфоциты в условиях отсутствия и при стимуляции Т-клеток.
2. Обнаружить в мезенхимных стромальных клетках изменения транскрипционной активности генов (IDO, NOS2, PTGS2, TGFB), ответственных за иммуносупрессию при совместной инкубации с лимфоцитами.
3. Установить изменение уровня и активности белков, которые наиболее важны для осуществления иммуносупрессии активированных Т-клеток под действием мезенхимных стромальных клеток.
4. Определить какие молекулы адгезии влияют на иммуносупрессию лимфоцитов, оказываемую мезенхимными стромальными клетками.
5. Определить изменения поверхностного фенотипа мезенхимных стромальных клеток и лимфоцитов при совместной инкубации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МАТЕРИАЛЫ

Иингибиторы iNOS L-NMMA (цитрат N^G-монометил-L-аргинин) (M7033-25MG Sigma) и IDO 1-MT (1-метил-D,L-триптофан) (860646-250MG Sigma).

Человеческие антитела против: ICAM-1 SC-107L (блокирующее, Santa Cruz), IDO (H-110 sc-25808 Santa Cruz), iNOS (aa 781-798, Clone 2D2-B2, MAB9502, R&D systems), CD28 NA/LE (BD 555725), CD3 NA/LE (BD 555336). Вторичные кроличьи и мышинные антитела были любезно предоставлены Дмитрием Николаевичем Пеньковым и доктором Франческо Блази из Института молекулярной онкологии (IFOM) в Милане.

Флуоресцентные человеческие антитела для цитометрии против: CD4 (558116, BD Pharmingen), CD25 (555346, BD Pharmingen), CD45 (304026, Biolegend), CD3 (300431, Biolegend), CD11b (557321 BD Biosciences), CD14 (555397 BD Biosciences), CD90 (328110, Biolegend) CD73 (344006, Biolegend), HLA-DR (307610, Biolegend), CD8(335787 BD Biosciences), ICAM-1 (sc-107 PE Santa Cruz), VCAM-1 (sc-18854 PE Santa Cruz).

Пластик и реактивы для работы с клеточными культурами: серологические пипетки (Greiner), полупроницаемые вставки для планшетов с размером пор 0,4 мкм (Greiner 665640), 12-луночные планшеты (Greiner 665180), культуральные чашки 100 мм (Corning 430167), культуральная среда DMEM/F12 1:1 (HyClone SH30271.01), L-глутамин 146 мг (ПанЭко Ф032), Пенициллин-Стрептомицин 5 мл (ПанЭко А063), раствор Версена (ПанЭко Р080), раствор фикола (ПанЭко Р052п), фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (ФСБ) без кальция и магния (HyClone SH30028.02), 1М раствор HEPES (HyClone SH30237.01), фетальная бычья сыворотка (ФБС) типированная (Thermo Fisher Scientific SH30070.02), 0,25% раствор трипсина (HyClone SV30031.01), раствор Хенкса модифицированный (HyClone SH30031.02), краситель CyQUANT®NF (C35006, Invitrogen).

Прочие реактивы: TRIzol® Reagent (Invitrogen, 15596-018), хлороформ ХЧ (Хим Реактив), спирт изопропиловый (Пропанол-2), ОСЧ, (800г ХИММЕД 0000537), Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (K0221 Thermo Fisher Scientific), SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (34078 Thermo Fisher Scientific).

Доноры МСК и лимфоцитов

МСК выделяли из подкожной жировой клетчатки во время операций грыжесечения от 6 пациентов, не страдающих инфекционными, системными или онкологическими заболеваниями, после подписания ими информированного согласия. Операции проводились в отделении герниологии и пластической хирургии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А. В. Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Лимфоциты получали из периферической крови 6 здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет.

МЕТОДЫ

Выделение и культивирование МСК жировой ткани человека

Полученную жировую ткань промывали двумя объемами раствора Хэнкса, содержащего 4х раствор антибиотика (400 ед/мл пенициллина) / антимикотика (400 мкг/мл стрептомицина) (HyClone, США) измельчали ножницами и инкубировали с раствором Хэнкса (без антибиотика, так как это снижает активность ферментов), содержащего коллагеназу I типа (200 ед/мл, Worthington Biochemical, США) и диспазу (40 ед/мл, Sigma, Германия) при 37°C в течение 30-45 мин. После этого добавляли равный объем среды DMEM/F12 (HyClone), содержащей 2х раствор пенициллина (100 ед./мл)-стрептомицина (100 мкг/мл) (ПанЭко), 2 мМ глутамина (ПанЭко), 10 мМ раствор HEPES (HyClone), 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone) (далее стандартная среда культивирования). Остановка ферментативной реакции осуществлялась компонентами сыворотки, содержащейся в среде культивирования. Полученную суспензию центрифугировали при 200g 10 мин, при этом МСК и другие клетки крови (эритроциты, лейкоциты) оседали на дно пробирки, в то время как адипоциты оставались в супернатанте. Осадок ресуспендировали в буфере для лизиса эритроцитов, содержащем 154 мМ NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃ и 0,1 мМ ЭДТА (20X избыток по отношению к объему осадка) и инкубировали в течение 1 мин. Затем добавляли равный объем стандартной среды культивирования и центрифугировали 200g 10 мин. Осадок ресуспендировали в стандартной среде культивирования, фильтровали через 100 мкм нейлоновое сито (Thermo Fisher Scientific), и полученную суспензию помещали в чашки диаметром 10 см (Corning Costar, США). Клетки инкубировали в 10 мл среды при 37°C и 5% CO₂. Среду культивирования заменяли свежей каждые 2-3 дня. По достижении 70-80% монослоя клетки рассевали. В эксперименте использовали клетки IV пассажа.

Пассирование МСК

Клетки дважды промывали раствором Версена (ПанЭко) комнатной температуры, и инкубировали с 3 мл раствора, содержащего 1,5 мл Версена (ПанЭко) и 1,5 мл 0,25% трипсина при 37°C 5 мин (HyClone). Действие фермента нейтрализовывали сывороткой в стандартной среде культивирования, собирали клетки и центрифугировали суспензию 10 мин при 200g. Осадок ресуспендировали и высаживали клетки в соотношении 1:4 от исходного количества (или примерно $10\text{-}15 \cdot 10^5$ клеток на чашку диаметром 10 см).

Выделение лимфоцитов периферической крови

Кровь здоровых доноров (25-50 мл) добавляли в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (1,5 мг на мл крови, рН 6,3) в растворе Хэнкса без ионов Ca^{2+} (Ca^{2+} способствует агрегации клеток и их неспецифической активации, далее все растворы без кальция и магния). Разведенную кровь инкубировали 40 мин при комнатной температуре и наслаивали около 25 мл на 20 мл раствора фиколла ($\rho=1,077$ г/см³ ПанЭко), центрифугировали 25 мин при 400g (тормоз центрифуги должен быть выключен). В градиенте плотности, происходит расслоение крови на фракции: самая верхняя фракция содержит плазму с липопротеидами различной плотностии тромбоцитами, на дно пробирки оседают эритроциты и гранулоциты, а на итерфазе между плазмой и фиколлоом образуется кольцо, содержащее лимфоциты с примесью моноцитов (в дальнейшем лейкоциты периферической крови, ЛПК). Фракцию ЛПК переносили в чистые пробирки, несколько раз промывали раствором Хэнкса при 250g 10мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера для лизиса эритроцитов, содержащего 154 мМ NH_4Cl с рН 7,4, 10 мМ KHCO_3 , и 0,1 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, в течение 1 мин. Затем добавляли пять объемов стандартной среды культивирования, центрифугировали и считали количество живых клеток в камере Горяева, окрашивая мертвые клетки трипановым синим (HyClone) с помощью стандартного протокола.

Выделенную суспензию ЛПК анализировали, инкубируя клетки с флуоресцентными антителами к CD4, CD8, CD25, CD3, а затем определяли долю окрашенных клеток с помощью проточной цитометрии, с целью определить пропорцию спонтанно активированных клеток, несущих α -субъединицу рецептора IL-2 (CD25) в популяции CD4 Т-клеток (данная процедура также способствовала исключению из выборки доноров с активированной иммунной системой). В эксперимент брали клетки с долей CD25⁺ клеток не более 5%. Также для оценки чистоты популяции полученную фракцию ЛПК дополнительно

окрашивали антителами к маркерам моноцитов CD14 и CD11b. Доля клеток с такими маркерами не превышала в наших экспериментах 12%, в то время как общая пропорция CD3 лимфоцитов составляла 60-70% (данные не представлены).

Затем проводили активацию полученных ЛПК либо процедуру сортировки клеток. Для идентификации CD4 Т-хелперов в сложной смеси мы предварительно окрашивали фракцию ЛПК антителами, конъюгированными с флуорофорами, к маркерам CD45, CD3 и CD4. Процедуру сортировки проводили на клеточном сортере BD FACSAria™ III. Для сортировки мы брали популяцию Т-хелперов с фенотипом CD45⁺CD4⁺CD3⁺. Скорость сортировки составила $6 \cdot 10^6$ клеток/час, чистота – более 99%. Для повышения процента выживания очищенные клетки сортировали в раствор фосатно-солевого буфера (ФСБ), не содержащий кальция с 10% ФБС. Сортированные Т-хелперы центрифугировали и полученный осадок ресуспендировали в стандартной среде культивирования.

Стимуляцию Т-клеток осуществляли двумя способами – в случае изучения пролиферации и в предварительных экспериментах ЛПК стимулировали фитогемагглютинином (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл (Sigma Aldrich L2769-5MG) в течение 6 часов при 37°C и 5% CO₂. Во всех остальных экспериментах стимуляцию проводили с помощью антител к компоненту системы Т-клеточного рецептора CD3 1 мкг/мл и молекуле дополнительной стимуляции CD28 0,5 мкг/мл, иммобилизованных на дне 12-луночных планшетов (Corning) с содержанием клеток $2,5 \cdot 10^6$ на лунку в течение 48 часов.

Совместная инкубация МСК и лимфоцитов

МСК жировой ткани человека инкубировали в стандартной среде в 12-луночных планшетах в концентрации $50-55 \cdot 10^3$ клеток на лунку при 37°C 48ч. Затем среду культивирования меняли на новую и добавляли активированные или не стимулированные ЛПК (либо сортированную популяцию CD4 лимфоцитов). МСК и лимфоциты инкубировали в контактных и бесконтактных условиях с использованием полупроницаемых мембран (Transwell) с диаметром поры 0,4 мкм (Greiner) в течение 48 ч при 37°C или в течение более длительного времени (в зависимости от эксперимента).

Сбор МСК и лимфоцитов для анализа

Сбор лимфоцитов осуществляли тремя различными способами в зависимости от условий культивирования. В случае культивирования лимфоцитов без МСК после отбора среды клетки инкубировали с раствором NuQTase™ (NuClone) 10 мин при 37°C (1 мл на лунку 12-луночного планшета) и затем отбирали, добавляя избыток ФСБ в лунку. Раствор

HyQTase™ был использован в связи с его более щадящим, чем трипсин, действием на клетки и их поверхностные белки за счет подобранного набора коллагеназ, направленных на открепление клеток от матрикса или от пластика. Вдобавок HyQTase™ не требует дополнительной инактивации с помощью сыворотки. В бесконтактных условиях инкубации с МСК лимфоциты собирали путем добавления в вставку с мембраной избытка ФСБ. После легкого перемешивания находящиеся на полупроницаемой мембране лимфоциты аккуратно отбирали, избегая повреждений в полупроницаемой мембране. В контактных условиях инкубации с МСК для отделения прикрепившихся лимфоцитов использовали многократную промывку раствором ФСБ без кальция, не обладающим протеолитической активностью. Это сохраняло монослой МСК и препятствовало попаданию их в образец с лимфоцитами. Для отбора МСК, оставшихся после инкубации с лимфоцитами или культивируемых отдельно, также использовали раствор HyQTase™.

Оценка пролиферации ЛПК

Для исследования способности МСК жировой ткани угнетать пролиферацию активированных ЛПК использовали коммерческий набор реактивов CyQUANT®NF Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, США). CyQUANT®NF обладает максимумом флуоресценции при 530 нм и интеркалируя в двухцепочечную ДНК, связывается с ней в 6 раз эффективнее чем с одноцепочечной мРНК [124]. Проводили инкубацию МСК и активированных ЛПК в указанных соотношениях (1/100, 1/50, 1/25, 1/12,5 МСК к ЛПК соответственно) 1-6 суток при 37°C. Оценку пролиферации проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Супернатант, содержащий ЛПК (100 мкл), центрифугировали (250 g), растворяли полученный осадок в однократном растворе Хэнкса, добавляли к клеткам краситель CyQUANT®NF или пермеабиллизующий агент (контроль для определения фонового сигнала), инкубировали в темноте 1 ч при 37° С. ЛПК, инкубируемые в стандартной среде, использовали для построения калибровочной кривой зависимости сигнала флуоресценции от количества клеток ($100-10 \cdot 10^3$) с шагом разведения 2. Интенсивность флуоресценции образовавшегося комплекса красителя с ДНК измеряли при 530 нм, возбуждая ее лазером при 485 нм, на приборе ZENYTH 3100 (Anthos, Австрия). Полученные данные флуоресценции в различных условиях нормировали на соответствующие значения в контролях (активированные ЛПК в среде культивирования) и выражали результат в процентах.

Окрашивание клеток антителами и анализ с помощью проточной цитофлуориметрии

Клетки (МСК или лимфоциты) промывали раствором ФСБ без кальция (HyClone), путем центрифугирования при 200g и ресуспендировали осадок в 100 мкл раствора ФСБ без кальция, содержащего 1% БСА. В полученную суспензию добавляли конъюгированные с флуорофорами антитела к клеточным маркерам в концентрации, рекомендуемой фирмой-производителем, и инкубировали на льду в течение часа без доступа света. По окончании инкубации клетки дважды промывали раствором ФСБ без БСА (200g) и проводили анализ на проточном цитометре FACS CANTO II (BD Bioscience). Данные обрабатывали с помощью пакета программ FLOWJO. Так как целью исследования было изучение популяции CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов (в случае лимфоцитов), определяли долю клеток, несущих CD25 или ICAM-1, среди CD4 лимфоцитов, полученные значения сравнивали со значениями в контрольных образцах (лимфоциты без воздействия МСК), которые в дальнейшем принимали за 100% или единицу. При изучении МСК в анализе использовали популяцию с маркерами CD73, CD90, CD105 на поверхности клеток, которая была негативна по CD3 и CD45. В качестве контролей использовали образцы МСК, не взаимодействовавшие с лимфоцитами. Результаты представляли в виде процентного сравнения долей клеток, несущих ICAM-1 или HLA-DR, либо CD86, полученных в экспериментальных образцах, с контролем.

Оценка апоптоза лимфоцитов

Лимфоциты (активированные или интактные), собранные после инкубации с МСК и культивированные отдельно, промывали раствором ФСБ без кальция (HyClone), путем центрифугирования при 200g и ресуспендировали осадок в 100 мкл раствора 1x Binding buffer (BD). К полученной суспензии добавляли 5 мкл конъюгированных с PE антител к Аннексину V (BD) и 5 мкл 7-аминоактиномицина (7-AAD) (BD) (для детекции мертвых клеток) и перемешивали. Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре 20 минут, затем промывали избытком 1x Binding buffer при 200g и полученный осадок ресуспендировали в 400 мкл 1x Binding buffer, после чего анализировали на проточном цитометре FACS CANTO II в течение часа после инкубации. В качестве апоптотических лимфоцитов считали популяцию, AnnexinV⁺7AAD⁻. Процент апоптоза оценивали путем сравнения с контролем – доля AnnexinV⁺7AAD⁻ лимфоцитов, культивируемых без МСК.

Получение прижизненных изображений клеток

Для анализа методом флуоресцентной микроскопии МСК и лимфоциты, предварительно меченые флуоресцентными красителями: МСК с CellTrace™ Calcein Green, AM (C34852 ThermoFischer), а ЛФ с CellTrace™ Calcein Red-Orange, AM (C34851 ThermoFischer) по рекомендациям производителя (клетки в количестве от $5 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ инкубировали в 1 мл среды культивирования без сыворотки с конечной концентрацией красителя 2,5 мкМ, 30 мин, 37°C), культивировали как описано в пункте «Совместная инкубация МСК и лимфоцитов» Изображения клеток получали, используя инвертированный микроскоп Axio Vert A1 (Carl Zeiss, Германия) с объективами C-Apochromat 10x/0,45 W увеличение 10x (Carl Zeiss, Германия) для флуоресценции и LD A-Plan 20x/0.35 Ph1-M27 (Carl Zeiss, Германия) увеличение 20x для фазового контраста, в начале и через 48 часов после начала инкубации МСК и ЛФ. Флуоресценцию возбуждали лазерами с длинами волн 488 (МСК) и 543 (ЛФ) нм, эмиссию детектировали с помощью полосовых светофильтров 500–530 нм и 560-590 нм, соответственно. Изображения клеток получали при экспозициях 27 мс для МСК и 300 мс для ЛФ, фазовый контраст – 50 мс. Изображения, полученные в разных каналах флуоресценции, накладывали друг на друга с помощью программы ImageJ.

Выделение мРНК из клеточных лизатов

Для выделения мРНК из лимфоцитов и МСК суспензии собранных клеток центрифугировали, осадок растворяли в 800 мкл реагента TRIzol (Invitrogen, США) и инкубировали ночь при 4°C. Выделение тотальной РНК проводили в соответствии с протоколом производителя. Осадок РНК растворяли в воде без нуклеаз (Invitrogen). Чистоту (соотношение поглощения раствора при длиннах волн 260/280) и концентрацию полученной РНК (по поглощению раствора при 260 нм) определяли с помощью прибора Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США). От возможных примесей ДНК избавлялись с помощью DNase I (EN0521 Thermo Fisher Scientific) при 37°C в течение 30 минут. Для остановки реакции к смеси добавляли 10x раствор 50мМ ЭДТА. Полученные образцы хранили на -70°C.

Получение кДНК методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени

С помощью обратной транскриптазы Superscript III (Invitrogen) на матрице тотальной РНК синтезировали кДНК в соответствии с инструкциями производителя. Полученную кДНК использовали для сравнения уровня экспрессии генов интереса полуколичественным методом Лайвака [Livak K. J., 2001]. Для проведения полимеразной цепной реакции

(ПЦР) в реальном времени использовали коммерческий набор реактивов 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermoscientific), содержащий 10 mM дНТФ с дУТФ, AmpliTaq Gold® ДНК полимеразу (5000 ед/мл) и интеркалирующий с ДНК краситель SYBR Green I, а также дополнительный краситель ROX, нормализующий сигнал флуоресценции от ПЦР. В реакционную смесь также добавляли 10 пмоль каждого праймера и 500 нг полученной кДНК. Суммарный объем смеси составлял 25 мкл. Программа ПЦР состояла из денатурации ДНК при 95°C, затем 35 циклов (денатурация 95°C, 15 сек; «отжиг» 58-64°C (в зависимости от праймера), 15 сек; элонгация 72°C, 10 сек), завершающая элонгация 72°C, 4 минуты. Оценку специфичности продукта, получающегося в ходе ПЦР, проводили путем исследования кинетики плавления продукта по флуоресценции в температурном диапазоне от 50 - 99°C. Оценка накопления продукта ПЦР проводилась детектирующим амплификатором ДТ-96 (ДНК-Технология) путем регистрации флуоресценции SYBR Green I. На основании полученных данных, опираясь на значения флуоресценции основного сигнала за вычетом фона, программное обеспечение амплификатора рассчитывало значения СТ (точка пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии), которые использовали для дальнейшего анализа. Результаты представляли в виде относительных единиц, полученных в ходе нормирования значений экспрессии гена в эксперименте на значения в контрольных образцах МСК и лимфоцитов. Для определения уровня экспрессии генов интереса использовали специфические олигонуклеотидные праймеры, представленные в таблице 1. В качестве дополнительного внутреннего контроля при оценке уровня мРНК ICAM-1 в случае контактных взаимодействий образцы с МСК анализировались на уровень мРНК субъединиц δ (CD3d) и ϵ (CD3e), образующих комплекс Т-клеточного рецептора CD3. Полученные данные сравнивали со значениями, полученными при аналогичном анализе образцов лимфоцитов без МСК, принимаемых за 100%. Если данные по CD3 в МСК превышали границу в 5%, то такие образцы исключали из рассмотрения.

Таблица 5

Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	«Прямой» праймер	«Обратный» праймер
Actin β	5'-cctggcaccagcacaat-3'	5'-gggccggactcgctacac-3'
IDO	5'-agcccctgacttatgagaacatgga-3'	5'-ccagccagacaatatatgcgaagaa-3'
NOS2	5'-atggcacacgctatggaaaactc-3'	5'-ctagacgtgcaaggcgctgtgact-3'

Продолжение таблицы 5

Ген	«Прямой» праймер	«Обратный» праймер
ICAM1	5'-аaccgccagcgggaagatcaaga-3'	5'-tcaggaggcgtggccttggtg-3'
PTGS2	5'-tcacgcatcagttcaagacagat-3'	5'-tacatcatcagaccaggcaccaga-3'
TGFB	5'-cccagcatctgcaaagctc-3'	5'-gtcaatgtacagctgccgca-3'
CDH2	5'-caggattgtgggtgcggggc-3'	5'-tggcgttcttatcccggcgt-3'
CDH3	5'-tccgcctccgaccaagacca-3'	5'-tagtctcctccccgccacc-3'
CDH1	5'-cttccccgccctgccaatcc-3'	5'-ataaggcggggctgtgggg-3'
CDH13	5'-acagatctcagggtacaagtgtgct-3'	5'-tgaggagcaggactgagggca-3'
SELE	5'-agcaccattctcctctggcttcg-3'	5'-ccatctgattcaaggcttggcagc-3'
SELP	5'-aggtctgataatgggtgggacgct-3'	5'-tggctgtgaggattcaaggggca-3'
SELL	5'-actggggagatggtgagccc-3'	5'-gctgccttagttgtggcaggc-3'
CD3e	5'-accccagaggaagcaaccagaag-3'	5'-agccccagtgatgcagatgtcc-3'
CD3d	5'-atctaccgtgcaagttcattatcg-3'	5'-agccccagacagccttccagt-3'

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг

Клеточные осадки лизировали буфером, содержащим 50 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 1% ДСН (додецилсульфат натрия) 10% глицерин, в течение 30 мин на льду. Концентрацию тотального белка измеряли при помощи коммерческого набора реактивов Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225 Thermo Scientific), окрашивание бицинхониновой кислотой [259]. Измеряли оптическую плотность при 625 нм комплекса бицинхониновой кислоты с ионами Cu^{1+} , взаимодействующими с аминокислотными группами пептидных связей. Электрофоретическое разделение проводили по методу Леммли [140]. Для этого использовали комбинации разделяющего 12,5% (для IDO) или 9% (для iNOS) и 7,5% концентрирующего гелей. Приготовление гелей производили по стандартной методике, используя буферы для разделяющего (125 мМ Трис-НСl с рН 6.8 и 0.1% ДСН) и концентрирующего (375 мМ Трис-НСl с рН 8.8 и 0.1% ДСН) гелей, 30% раствор акриламида, содержащий 0,8% бисакриламида (sigma-aldrich A3574) и деионизированной воды.

Полимеризацию инициировали добавлением 10% персульфата аммония (sigma-aldrich A3678-25G) (10 мкл на 1 мл геля) и тетраметилэтилендиамида (1 мкл на 1 мл геля). Препараты белковых лизатов, смешанные с буфером для образцов (50мМ Трис-НСl рН 6,8,

10% глицерин, 1% ДСН, 1% β -меркаптоэтанол, 0,02% бромфеноловый синий) инкубировали 5 минут при 95°C и наносили на дорожки геля в количествах до 35 мкг тотального белка. Готовые гели помещали в камеру для электрофореза (Biorad, США), содержащую электродный буфер состава (25 мМ Трис-НСl, рН 8.6; 192 мМ глицин и 0.1% ДСН). Для электрофореза использовали буфер состава 25 мМ Трис-НСl, рН 8.6, 192 мМ глицин и 0.1% ДСН и условия: сила тока 30 мА, напряжение 100В (источник питания PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Bio-rad, США). В качестве маркеров молекулярного веса использовали смесь окрашенных белков (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder 26634 Thermo Scientific).

Электроперенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra RPN303E GE Healthcare) осуществляли по методу [279] и проводили в камере (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-rad), содержащей буфер для переноса 25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицин и 20% этиловый спирт в течение 60 минут для IDO и 90 минут для iNOS при силе тока 320 мА и напряжении 110В (источник питания Эльф-4, Днк-Технология). Затем мембрану промывали раствором ФСБ и помещали в блокирующий раствор (5% обезжиренное сухое молоко, в ФСБ с Tween 20 0,01%). Мембрану инкубировали ночь на 4°C при постоянной ротации. Затем проводили инкубацию с первичными антителами (стоки разводили в блокирующем растворе) против IDO (H-110 sc-25808 Santa Cruz, кроличьи, 1:500) 1 час, против iNOS (aa 781-798, Clone 2D2-B2, MAB9502, R&D systems, мышинные 1:500) 20 часов. После 4 5-минутных отмывок несвязавшихся антител раствором ФСБ/0,01% Tween 20 (ФСБТ) мембрану оставляли в растворе вторичных антител (1:3000), конъюгированных с пероксидазой хрена. Затем мембрану снова отмывали и инкубировали с люминесцентной системой SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (34078 Thermo Scientific). Сигнал детектировали при помощи рентгеновской фотопленки X-ray Film for Western Blot Detection (34088 Thermo Scientific). Для проявки использовали реактивы фирмы Kodak (США).

Ингибиторный анализ

Совместную инкубацию МСК и активированных лимфоцитов проводили в присутствии 1мМ ингибитора IDO 1-МТ (1-метил-D,L-триптофан, растворенный в DMSO) либо 1мМ ингибитора iNOS L-NMMA (N^G-метил-L-аргинин, растворенный в деионизованной воде), затем отбирали и анализировали супернатанты.

В случае ингибирования iDO анализировали содержание продукта его ферментативной активности – кинуренина - с помощью набора коммерческих реактивов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) (BA E-2200 LDN). Данный набор использует метод конкурентного связывания свободного кинуренина и кинуренина, адсорбированного на дне лунок, с антителами к кинуренину. После установления равновесия в системе свободный кинуренин и комплексы свободного кинуренина с антителами удаляют, после чего детектируют количество антител, связавшихся с адсорбированным кинуренином. Чем больше свободного кинуренина в растворе, тем меньше антител свяжется с адсорбированным сигналом, тем ниже будет оптическая плотность раствора. Ацилированные по инструкции производителя супернатанты культур, стандарты и контроли помещали в 96-луночный планшет, с адсорбированным на дне лунок кинуренином. Руководствуясь протоколом, проводили поочередно первичную инкубацию с антителами на кинуренин, затем отмывку и инкубацию с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой. Удаляли несвязавшиеся антитела и добавляли субстрат для пероксидазы, инкубировали 20 минут, реакцию останавливали 0.25 М раствором H_2SO_4 , и измеряли оптическую плотность раствора в лунках при 405 нм на спектрофотометре Zenyth 3100. После построения калибровочной стандартной кривой, которую аппроксимировали прямой, вычисляли концентрации кинуренина в исследуемых образцах. Результаты в образцах нормировали на контроли (супернатанты от МСК с добавлением ингибитора и супернатанты от МСК с добавлением DMSO, инкубируемые без лимфоцитов) и представляли данные в виде относительных единиц.

Чтобы оценить уровень ферментативной активности iNOS использовали коммерческий набор реактивов для детекции его продукта NO (K262-200, Biovision, США). Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Супернатанты помещали в 96-луночный планшет и инкубировали с нитратредуктазой для восстановления полученного нитрата в нитрит (так как NO активно реагирующее соединение, оно довольно быстро переходит в форму либо нитрата, либо нитрита). Затем добавляли реактив Грисса для получения азокрасителя красного цвета, количество которого соответствует содержанию нитрита в исследуемых образцах. Детекцию оптической плотности проводили при 540 нм. После построения калибровочной кривой по стандартам, предоставленным производителем, оценивали концентрацию нитрита в исследуемых образцах. Полученные результаты нормировали на контроли (супернатанты от МСК с добавлением

ингибитора и без, инкубируемые в отсутствие лимфоцитов) и представляли данные в виде относительных единиц.

Обработка данных

Для статистического анализа данных использовали пакеты программ STATISTICA 6 и SIGMA PLOT. Тест на нормальность проводили методом Шапиро-Уилка, с попарным сравнением Шидока-Холма или Даннета. Для непараметрических распределений использовали однофакторный дисперсионный анализ на рангах Крускала – Уоллиса с последующим тестом Тьюки. Для анализа нескольких выборок использовали критерий Манна-Уитни. Для построения графиков применяли пакет программ GRAPHPAD PRISMA 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Изучение иммуносупрессорных свойств МСК

1.1 Разработка системы и подбор условий для изучения иммуносупрессорных свойств МСК

В данной работе для изучения молекулярных механизмов иммуносупрессии мы использовали совместную инкубацию МСК и CD4 Т-лимфоцитов (в составе тотальной популяции лейкоцитов периферической крови (ЛПК), либо в виде очищенной популяции CD4 Т-клеток). Известно, что Т-клетки могут составлять от 40 до 70% ЛПК, при этом самой многочисленной группой среди Т-клеток является популяция CD4 лимфоцитов (30-50% от всех ЛПК) [54]. Известно, что при стимуляции ЛПК специфическими антителами к компоненту Т-клеточного рецептора - CD3 и молекуле дополнительной стимуляции CD28 происходит селективная активация именно Т-клеток [178]. Таким образом, при взаимодействии МСК с ЛПК в условиях активации Т-клеток специфическими антителами можно изучать эффекты, связанные с активацией Т-клеток, а также выделяемых при этом Т-клетками растворимых факторов на МСК, в то время как другие популяции в составе ЛПК не будут оказывать значимого влияния на МСК. В данной работе под лимфоцитами мы подразумеваем CD4 Т-лимфоциты в составе ЛПК, в случае использования очищенной популяции Т-клеток это будет оговорено особо.

Сначала мы подбирали условия стимуляции Т-клеток, а также условий совместного культивирования лимфоцитов и МСК, при которых наиболее сильно проявляются иммуносупрессорные свойства МСК. Мы инкубировали МСК с ЛПК, которые активировали фитогемагглютинином (ФГА). ФГА - это лектин, связывающий N-ацетилгалактозаминамы и галактозу гликолипидов на поверхности клеток. Обработка ФГА приводит к прилипанию клеток друг к другу [309]. В случае лимфоцитов это приводит к сближению Т-клеточных рецепторов, которое индуцирует активацию и пролиферацию стимулированных ФГА клеток [191]. Есть данные, что ФГА усиливает сигнальный путь от рецептора IL-1[9], а также способен имитировать активацию комплекса Т-клеточного рецептора, что приводит к запуску сигнального каскада NF-κB [21]. Стимуляция ФГА моделирует условия неспецифической активации Т-клеток, в результате которой клетки синтезируют и секретируют воспалительные факторы, действующие на МСК. Поскольку такая активация лимфоцитов не связана с конкретным антигеном и структурой Т-клеточного рецептора, это позволяет активировать подавляющее большинство Т-клеток в культуре. Усло-

вия сильной неспецифической стимуляции напоминают ситуацию в тканевом микроокружении при острой стадии воспалительного процесса. Однако из литературы известно, что ФГА способен лишь инициировать процесс пролиферации в лимфоцитах, а для его поддержки необходимы дополнительные сигналы, которые в очищенной популяции Т-клеток отсутствуют. Было показано, что для успешной активации лимфоцитов ФГА необходимы моноциты, присутствующие в ЛПК, которые под действием ФГА продуцируют ИЛ-6, способствующий выживанию и длительной пролиферации Т-клеток [42].

Чтобы определить условия, при которых наблюдается максимальная иммуносупрессия Т-клеток МСК мы варьировали три параметра: соотношения между клетками МСК к ЛПК, время инкубации, а также вид взаимодействия между МСК и ЛФ (контактный или бесконтактный). Для создания условий бесконтактного взаимодействия использовали вставки с полупроницаемой мембраной (Transwell, размер поры 0,4 мкм), позволяющие свободный обмен растворимыми факторами между МСК и лимфоцитами (Рис. 6.), но препятствующие образованию контактов между мембранами МСК и лимфоцитов. В качестве контроля использовали лимфоциты, инкубируемые без МСК в стандартной среде культивирования. Схема эксперимента представлена на Рис. 6.

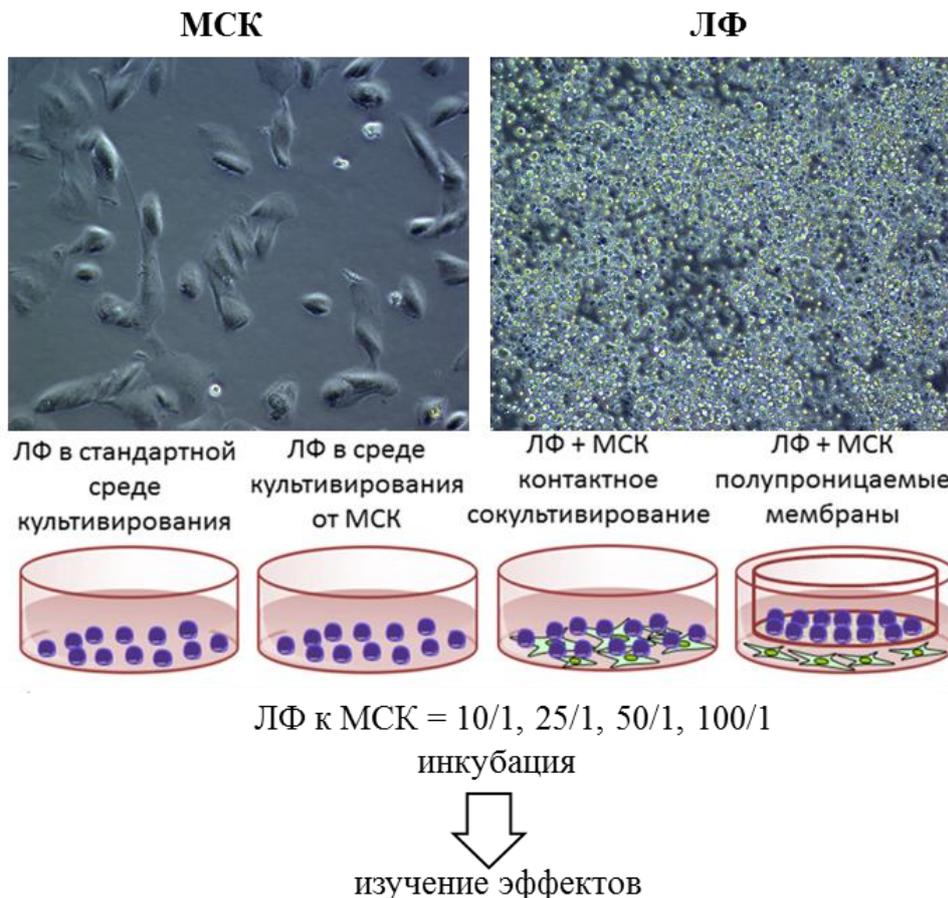


Рис. 6. Подбор условий для изучения иммуносупрессии. На рисунке микрофотографии (фазовый контраст) МСК и стимулированных лимфоцитов в составе фракции ЛПК, 20х увеличение, а также схема эксперимента по совместному культивированию МСК и лимфоцитов.

1.1.1 МСК снижают пролиферацию активированных лимфоцитов

В качестве одного из критериев иммуносупрессии МСК мы использовали уменьшение скорости пролиферации лимфоцитов, которую измеряли, определяя количество ДНК, содержащейся в клетках лимфоцитов после инкубации с МСК и в контрольных культурах. Для измерения количества ДНК выбрали метод, основанный на инкубации лизатов клеток с избытком низкомолекулярного красителя CyQUANT®NF. Данный метод позволяет оценить скорость пролиферации клеток. Поскольку зависимость увеличения количества ДНК от числа равномерно делящихся клеток линейна (в случае достаточно большого числа клеток), метод позволяет надежно определить количество клеток в диапазоне от 10000 до 100000.

Максимальный эффект иммуносупрессии был зафиксирован нами на вторые сутки совместной инкубации при соотношении клеток МСК к ЛФ, равном 1/25, что логично, поскольку Т-клетки имеют гораздо меньшие линейные размеры, чем МСК. Данный эффект проявлялся как при наличии, так и в отсутствии контактов между МСК и лимфоцитами. Следует отметить, что в случае контактных взаимодействий подавление пролиферации было выражено сильнее, что свидетельствует о возможном сочетанном действии растворимых молекул и прямых контактов МСК с ЛФ в процессе иммуносупрессии (Рис. 7А.). Эти наблюдения хорошо согласуются с данными Di Nicola и коллег, которые тоже наблюдали более выраженные супрессорные эффекты МСК при наличии контактов с ЛФ [76].

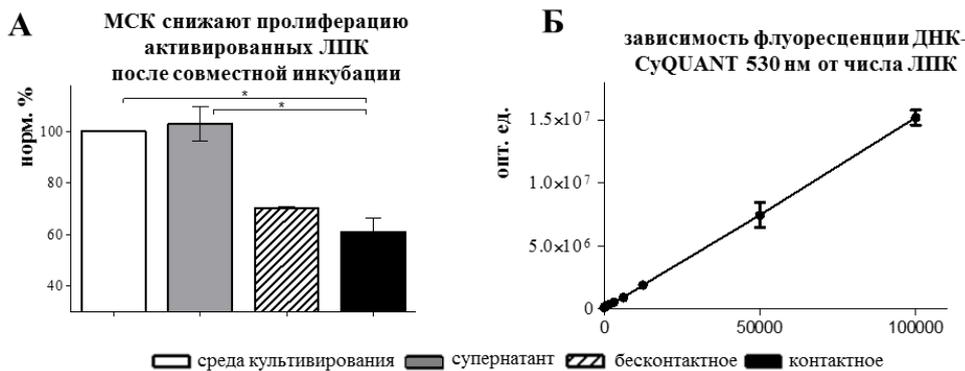


Рис. 7. Изучение иммуносупрессорных свойств МСК методом CyQUANT®NF. (А) - оценка пролиферации активированных (ФГА 10 мкг/мл) ЛПК при совместной инкубации с МСК;

данные представлены как $M \pm SEM$, $N=5$ (тест на Нормальность Шапиро-Уилка $p = 0,061$; попарное сравнение методом Шидока-Холма * $p < 0,05$). (Б) - зависимость уровня флуоресценции комплекса CyQUANT®NF-ДНК от концентрации клеток одного из 5 экспериментов. Среда культивирования – стандартная среда для проведения экспериментов, супернатант – среда культивирования, полученная от МСК, инкубируемых отдельно в течение 48 часов, контактное – культивирование МСК и активированных ЛПК в условиях контактов между клетками, бесконтактное – культивирование в отсутствии контактов между МСК и активированными ЛПК.

Снижение пролиферации также было подтверждено с помощью подсчета количества ЛПК после совместной инкубации с МСК по сравнению с контролем (Рис. 8.)

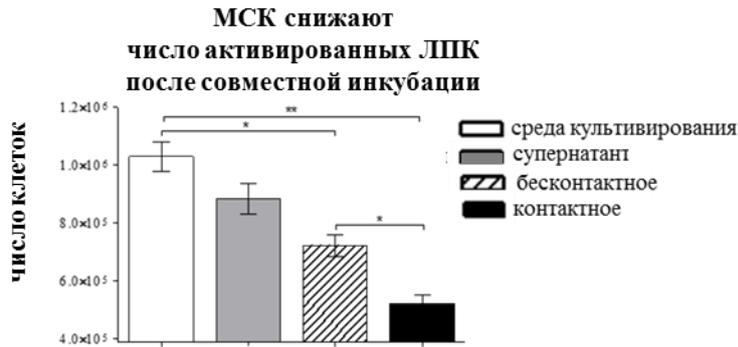
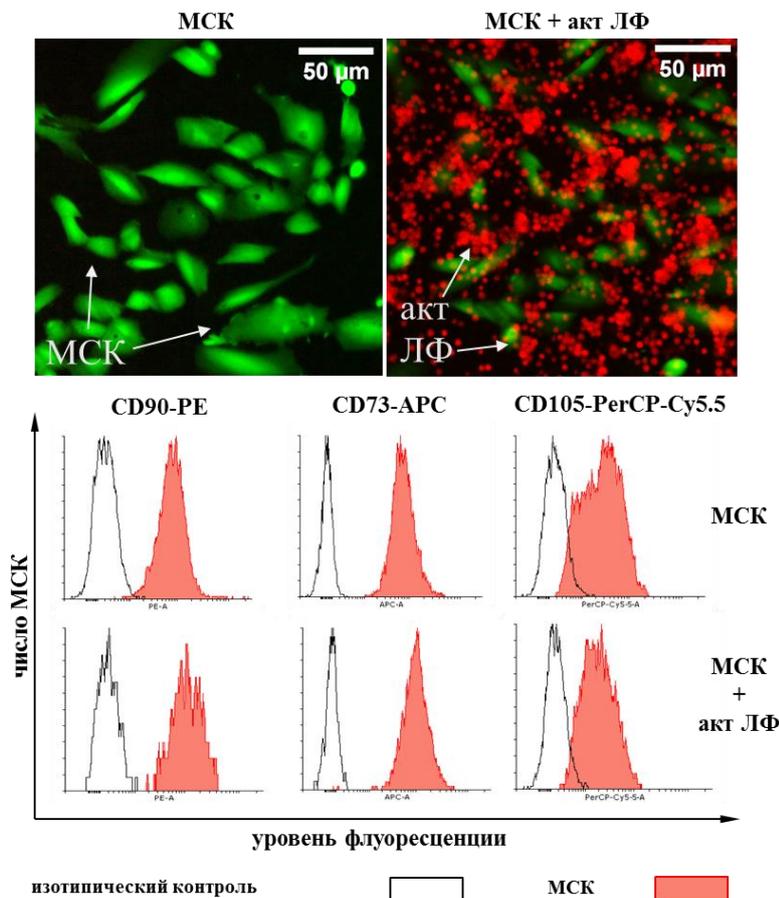


Рис. 8. Оценка числа активированных (ФГА 10 мкг/мл) ЛПК при совместной инкубации с МСК. Данные представлены как $M \pm SEM$ числа посчитанных в камере Горяева ЛПК, $N=5$ тест на Нормальность Шапиро-Уилка $p = 0,354$; попарное сравнение методом Шидока-Холма, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

При изучении иммуносупрессии мы также оценивали фенотипические изменения в МСК после совместной инкубации с активированными ЛПК. По нашим представлениям, воспалительное микроокружение может способствовать не только инициации иммуносупрессорной программы, но, возможно, и изменениям в фенотипе МСК, которые мы оценивали по уровню представленности характерных поверхностных маркеров, таких как CD90, CD73, CD105. Мы установили, что совместная инкубация МСК с лимфоцитами



контактным способом в течение 2 и более суток не приводит к изменению уровня этих основных маркеров на поверхности МСК (Рис. 9.)

Рис. 9. Оценка уровня поверхностных маркеров МСК до и после инкубации с активированными ЛПК контактным способом. На рисунке представлены микрофотографии, 10x увеличение, (флуоресценция) МСК (Calcein Green AM) и стимулированных ЛФ (Calcein Red-Orange AM) при контактной инкубации с МСК, а также репрезентативные гистограммы одного из 3 экспериментов зависимости уровня флуоресценции антител к основным маркерам МСК (CD90, CD73, CD105) от количества клеток до и после контактной инкубации МСК с ЛФ.

1.1.2 Инкубация с МСК не приводит к увеличению спонтанного апоптоза активированных лимфоцитов

Изменение в скорости пролиферации клеток, измеряемое по увеличению числа клеток, можно объяснить тем, что клетки стали быстрее делиться, либо тем, что они стали меньше погибать (например, от апоптоза). Мы предположили, что замедление пролиферации может быть обусловлено увеличением процента спонтанного апоптоза клеток в культурах активированных лимфоцитов, под действием МСК. Для этого мы детектировали фосфатидилсерин на поверхности лимфоцитов после взаимодействия с МСК, инкубируя их с аннексином-V-FITC, способным связываться с фосфатидилсерином [32]. Известно, что в норме фосфатидилсерин локализован во внутреннем фосфолипидном слое клеточной мембраны, однако, у апоптотических клеток он быстро перемещается на внешний, что позволяет, таким образом, детектировать клетки, находящиеся на ранней стадии апоптоза и еще сохраняющие целостность клеточной мембраны [147]. Для того чтобы детектировать клетки на поздней стадии апоптоза и мертвые клетки, мы также инкубировали лимфоциты с интеркалирующим в ДНК 7-аминоактиномицином (7-AAD). Мы ожидали, что контактная и бесконтактная инкубация активированных лимфоцитов с МСК будет способствовать спонтанному увеличению процента CD4 лимфоцитов, переходящих в ранний апоптоз (Annexin-V⁺7-AAD⁻). Однако, по нашим данным, оценка доли Annexin-V⁺7-AAD⁻ CD4 лимфоцитов с помощью иммуноцитофлуориметрии не выявила статистически значимых различий между контактной инкубацией, бесконтактной и контролем (активированными лимфоцитами, инкубируемыми отдельно) (Рис. 10 и Рис. 11.).

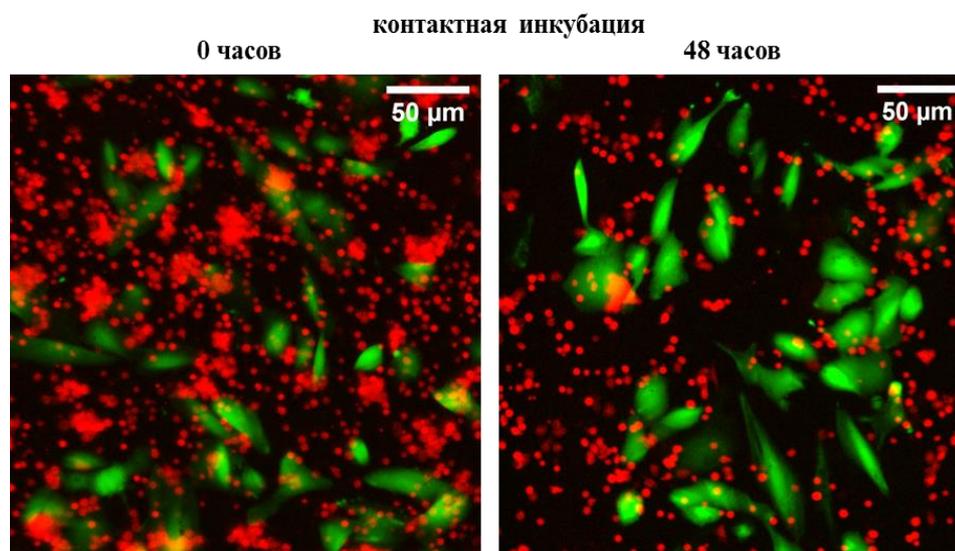


Рис. 10. МСК снижают число активированных ЛФ через 48 часов инкубации. Микрофотографии (флуоресценция) инкубации МСК (Calcein Green AM) и активированных ЛФ (Calcein Red-Orange AM) контактным способом в начале и в конце эксперимента, 10х увеличение.

МСК не влияют на долю Annexin-V+7-AAD- клеток среди CD4 лимфоцитов после совместной инкубации

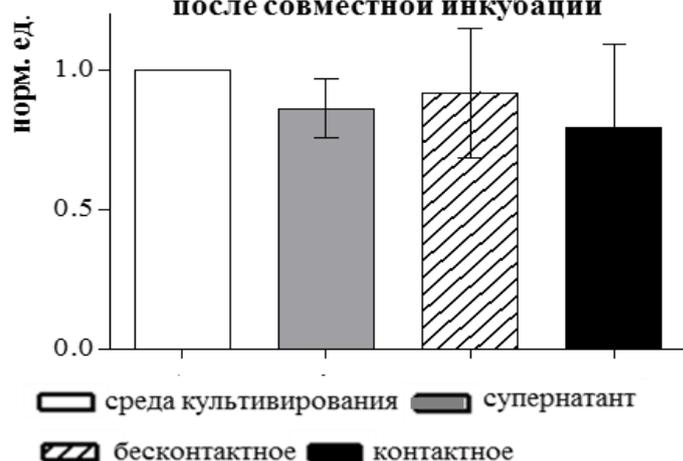


Рис. 11. Изучение влияния МСК на спонтанный апоптоз активированных лимфоцитов при совместной инкубации. Анализ апоптоза активированных (ФГА 10 мкг/мл) CD4 лимфоцитов после совместной инкубации с МСК, $M \pm SEM$, $N=5$. Данные представлены в виде доли Annexin-V+7-AAD- CD4 лимфоцитов, культивируемых в различных условиях, нормированной на контроль (активированные лимфоциты в составе ЛПК инкубируемые отдельно).

1.1.3 Негативный эффект МСК на пролиферацию активированных лимфоцитов сопровождается снижением на их поверхности уровня α -субъединицы рецептора IL-2 (CD25)

Из данных литературы известно, что угнетение пролиферации активированных Т-клеток, вызванное МСК, связано с инициацией у лимфоцитов ареста клеточного цикла, в ходе которого лимфоцит перестает отвечать на стимулирующие факторы, даже после удаления МСК из системы [301, 305]. Одним из признаков такого состояния является снижение маркера активации – α -субъединицы рецептора воспалительного цитокина IL-2 (CD25), жизненно важного «фактора роста» лимфоцитов, который обеспечивает их деление и выживание делящихся клеток [22].

Руководствуясь этим, мы предположили, что, возможно, в условиях изучаемой нами иммуносупрессии замедление пролиферации лимфоцитов под действием МСК также сопровождается снижением уровня CD25 на Т-клетках. Как и ожидалось, уровень CD25 на поверхности активированных CD4 лимфоцитов, а также количество клеток, несущих этот рецептор, было снижено по сравнению с контролем при инкубации с МСК в условиях наличия или отсутствия контактов между клетками. При этом контактная инкубация усиливала снижение уровня CD25 на лимфоцитах сильнее по сравнению с бесконтактной. (Рис. 12А-Б.). Схожие данные были получены в экспериментах с использованием очищенной CD4 популяции лимфоцитов (Рис. 12Б.). При изучении иммуносупрессорной активности МСК мы сравнивали снижение доли CD4CD25⁺ лимфоцитов, как в очищенной популяции, так и в составе ЛПК. Для активации лимфоцитов в том и другом случае использовали стимуляцию антителами к (CD3) и CD28 связывающейся с CD80/ CD86 на поверхности АПК.

Сравнение иммуносупрессорной активности МСК (снижение доли CD4CD25⁺ лимфоцитов) на CD4 лимфоциты в составе ЛПК или очищенной популяции CD4 Т-клеток статистически значимых различий не выявило. Этот факт позволяет нам предположить, что МСК действуют специфично и осуществляют иммуносупрессию только активированных CD4 (и CD8 – данные не представлены) Т-клеток и в том, и другом случае, что согласуется с данными, полученными другими [281].

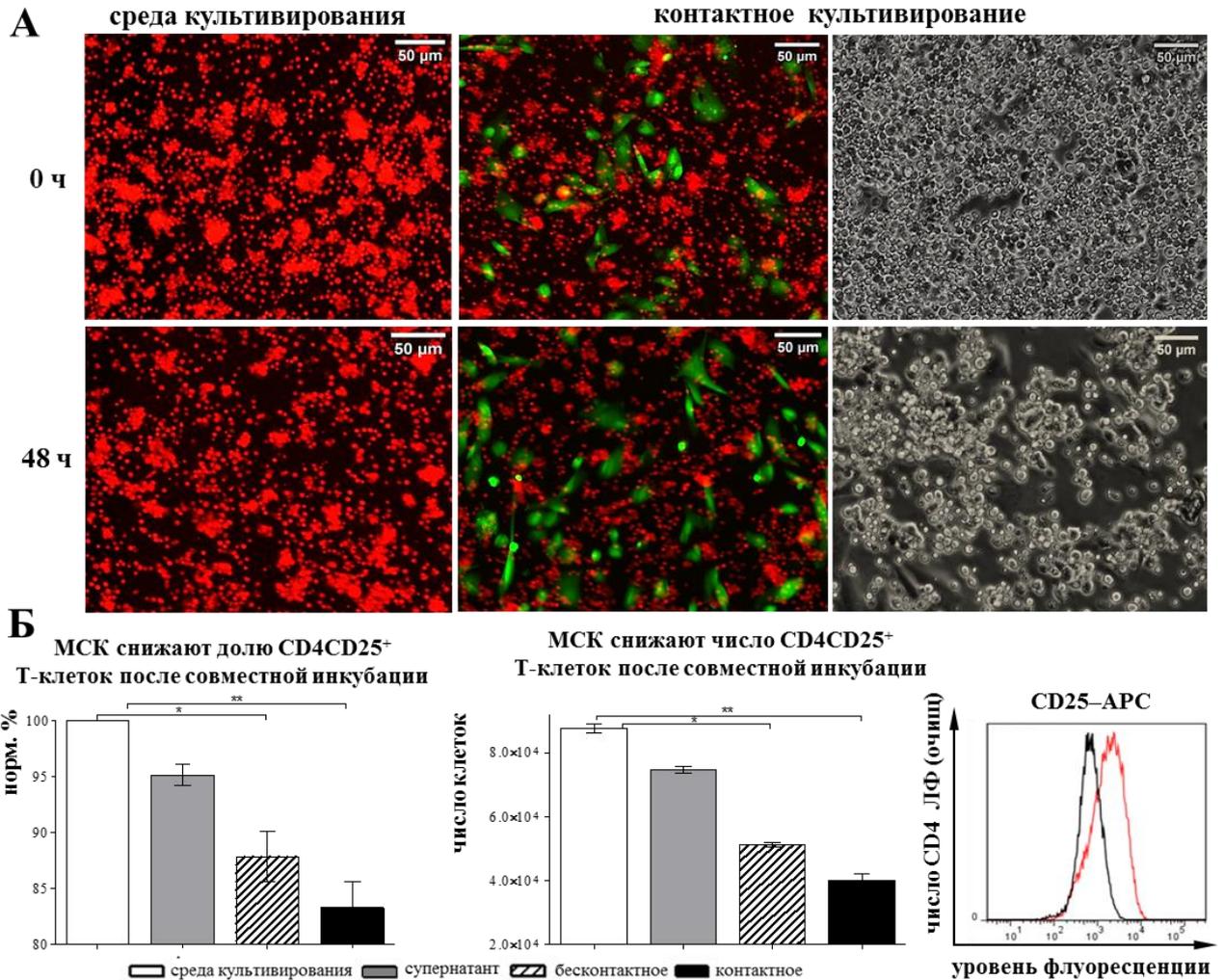


Рис. 12. Влияние МСК на уровень α -субъединицы рецептора IL-2 (CD25) на поверхности CD4 лимфоцитов при совместной инкубации. (А) Микрофотографии активированных (антителами против CD3 и CD28) ЛФ в среде культивирования (10x увеличение) и при контактной инкубации с МСК (10x - флуоресценция, 20x – фазовый контраст) в начале и через 48 часов. (Б) Изменение доли CD4CD25⁺ клеток среди активированных CD4 лимфоцитов после инкубации с МСК по сравнению с контролем. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=4$ (тест на Нормальность Шапиро-Уилка $p = 0,063$ (доля клеток) $p = 0,071$ (число клеток)); попарное сравнение методом Шидока-Холма * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Репрезентативные гистограммы сравнения процента CD25⁺ клеток среди очищенных Т-хелперов при контактной инкубации с МСК относительно контроля.

1.2 Супрессия лимфоцитов под действием МСК зависит от растворимых факторов

1.2.1 В бесконтактном механизме иммуносупрессии МСК участвует IDO

Мы детектировали эффект иммуносупрессии МСК на Т-клетки в условиях бесконтактного культивирования МСК с Т-клетками. Поэтому стало понятно, что совокупность секретируемых МСК молекул вносит существенный вклад в подавление деления Т-клеток и изменение их поверхностного фенотипа. Чтобы показать, что эффекторные молекулы, негативно влияющие на лимфоциты, находятся в кондиционной среде, мы собрали супернатанты от монокультуры МСК и культур МСК с интактными и активированными Т-клетками. Затем мы добавили эти супернатанты (от культур МСК и ЛФ в условиях контактной и бесконтактной инкубации) к активированным лимфоцитам и через 48 часов измеряли долю CD4CD25⁺ лимфоцитов. Как мы и предполагали, добавление супернатантов снижало долю CD4CD25⁺ клеток, что доказывает иммуносупрессорное действие растворимых молекул, продуцируемых МСК, на активированные лимфоциты. (Рис. 13А.). При этом добавление супернатанта от контактной инкубации приводило к максимальному снижению доли CD4CD25⁺ клеток, по сравнению с контролем. Аналогичный эксперимент мы провели на очищенной популяции CD4 Т-хелперов, получив очень похожие данные (Рис. 13Б.).

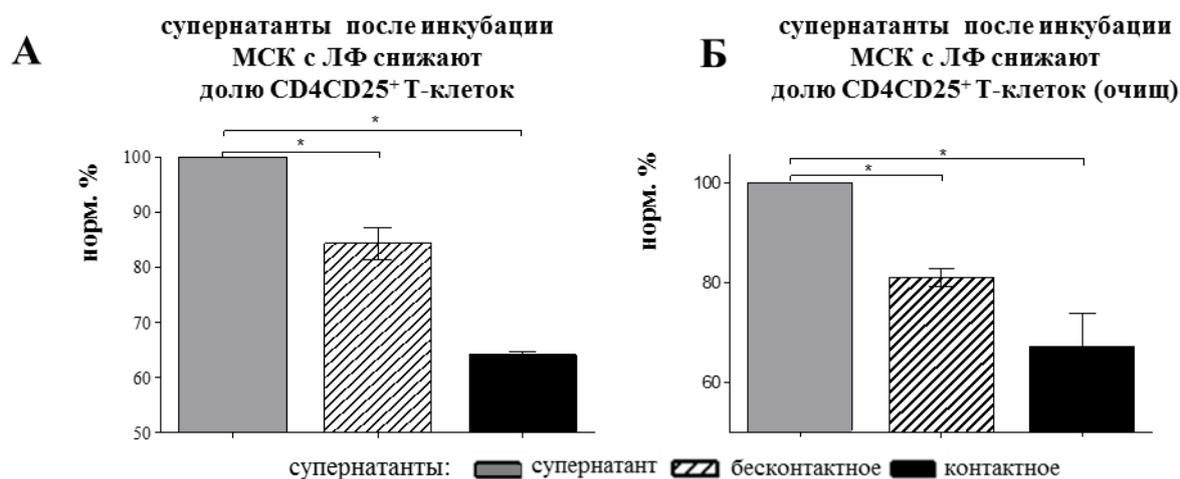


Рис. 13. Негативное влияние супернатантов после совместной инкубации МСК с лимфоцитами на долю активированных CD4CD25⁺ клеток в составе лимфоцитов (А) и очищенной популяции CD4 Т-клеток (Б). Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=3$. А - тест на Нормальность Шапиро-Уилка $p = 0,073$; попарное сравнение методом Шидока-Холма, Б – однофакторный дисперсионный анализ на рангах Крускала – Уоллиса с последующим тестом Тьюки; * $p < 0,05$.

В настоящее время эффект растворимых факторов, таких как IDO и синтезируемый iNOS оксид азота (II) (NO), уже описаны в литературе. Особенно подробно этот вопрос

изучен на клетках мышей. В то же время, для клеток человека в экспериментах *in vitro* до сих пор не показано, что включение генов соответствующих белков прямо приводит к изменению уровня и активности их белковых продуктов, что, в результате, приводит к иммуносупрессии. Кроме детального изучения молекулярных механизмов, приводящих к синтезу супрессорных молекул и синтезу низкомолекулярных продуктов, мы решили изучить действие этих продуктов на Т-клетки. Для этого мы использовали специфические ингибиторы активности ферментов, продукты которых нужны для иммуносупрессии, а также определяли уровень соответствующих продуктов в смешанных культурах МСК-лимфоциты.

Мы изучили влияние супернатантов после контактной и бесконтактной иммуносупрессии на транскрипционную активность МСК. В первую очередь, нас интересовало изменение уровня мРНК факторов, которые, согласно литературе, участвуют в МСК-опосредованной иммуносупрессии (IDO, COX2, TGF- β). Добавление супернатантов, полученных после контактной и бесконтактной иммуносупрессии к МСК, культивируемым отдельно, приводило к увеличению в них уровня мРНК IDO (Рис. 14.).

В отличие от IDO, уровни мРНК COX2 и TGF- β в МСК статистически значимо не изменялись (данные не представлены).



Рис. 14. Влияние супернатантов после контактной и бесконтактной иммуносупрессии на транскрипционную активность МСК. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=3$ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; попарное сравнение методом Шидока-Холма) IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа.

Обнаружив увеличение уровня мРНК IDO в МСК после добавления супернатантов от иммуносупрессии, мы изучили этот феномен более подробно и детально. В первую очередь нас интересовал вопрос, является ли увеличение уровня мРНК IDO в МСК специфическим ответом на воспалительное микроокружение, создаваемое активированными лимфоцитами, или же МСК реагируют таким способом на появление лимфоцитов в системе? Мы инкубировали МСК с активированными и интактными лимфоцитами контактным и бесконтактным способом. Мы установили, что увеличение уровня мРНК IDO в МСК связано с добавлением лимфоцитов в систему в принципе. Но уровень увеличения экспрессии гена IDO зависит от степени активации лимфоцитов. Так уровень мРНК в условиях

совместной инкубации МСК с активированными лимфоцитами превышал на 2 порядка уровень мРНК IDO при инкубации МСК с интактными лимфоцитами. Также мы обратили внимание на то, что, независимо от степени активации лимфоцитов, при бесконтактной инкубации уровень мРНК IDO в МСК был выше, чем в условиях контактной инкубации (Рис. 15А.). Как известно, уровень мРНК не всегда соответствует конечному уровню синтезируемого белкового продукта. В связи с этим, необходимо было удостовериться в том, что обнаруженный нами высокий уровень мРНК IDO будет коррелировать с уровнем синтезируемого белка. Мы провели анализ лизатов МСК, полученных после совместной инкубации с лимфоцитами, определив уровень белка IDO методом иммуноблоттинг. Мы обнаружили, что на уровне белка в МСК IDO детектируется только в условиях инкубации МСК с активированными лимфоцитами (Рис. 15Б.). Отсутствие IDO на уровне белка в МСК при инкубации с не стимулированными лимфоцитами можно объяснить быстрой протеасомной деградацией молекул белка или блокировкой трансляции мРНК IDO. Также мы удостоверились в том, что при контактной инкубации с лимфоцитами уровень белка IDO в МСК значительно ниже, чем при бесконтактной, что подтверждает данные анализа изменения уровня мРНК IDO в МСК, проведенного нами ранее (Рис. 15А.).

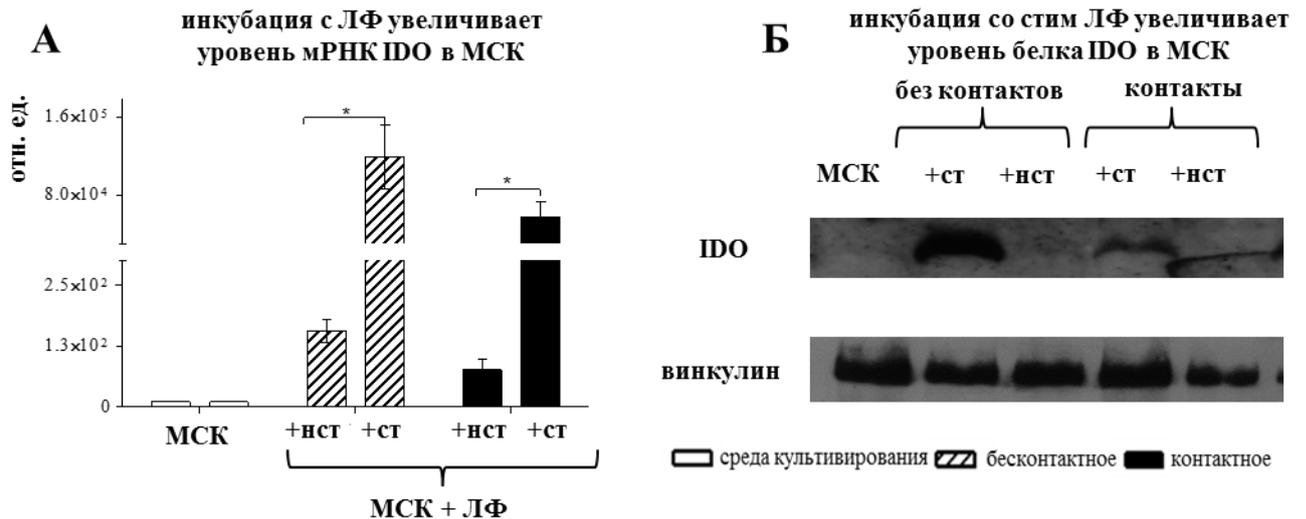


Рис. 15. Анализ уровня изменения IDO в МСК при инкубации со стимулированными и не стимулированными лимфоцитами. (А) – анализ изменения уровня экспрессии гена IDO в МСК. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=6$; * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). (Б) Репрезентативные данные иммуноблоттинга лизатов МСК после инкубации со стимулированными и не стимулированными лимфоцитами одного из 6 экспериментов, нст – не стимулированные лимфоциты, ст – стимулированные лимфоциты.

1.2.2 Ингибирование ферментативной активности IDO значительно снижает иммуносупрессорное действие МСК

Продуктом активности IDO являются токсичный для лимфоцитов кинуренин и его метаболиты. Мы хотели выяснить, влияет ли ингибирование активности IDO на уровень синтеза его мРНК в МСК, а также является ли снижение концентрации кинуренина, продуцируемого IDO, достаточным условием для блокировки иммуносупрессии, которую мы оценивали по числу клеток и изменению доли CD4CD25⁺ лимфоцитов. Мы блокировали ферментативную активность IDO специфическим ингибитором IDO, 1-метил-D,L-триптофаном (1-МТ). Мы инкубировали МСК с активированными лимфоцитами в присутствии 1-МТ, в контактных и бесконтактных условиях культивирования. Предварительно мы убедились, что ни сам ингибитор, ни его растворитель на рост и пролиферацию МСК, инкубируемых отдельно, не влияют (данные не представлены).

Добавление 1-МТ приводит к статистически значимому увеличению доли активированных CD4CD25⁺ Т-клеток, инкубируемых с МСК (Рис. 16А.). Схожие результаты были получены и при оценке общего числа лимфоцитов после инкубации с МСК в присутствии 1-МТ (Рис. 16Б.).

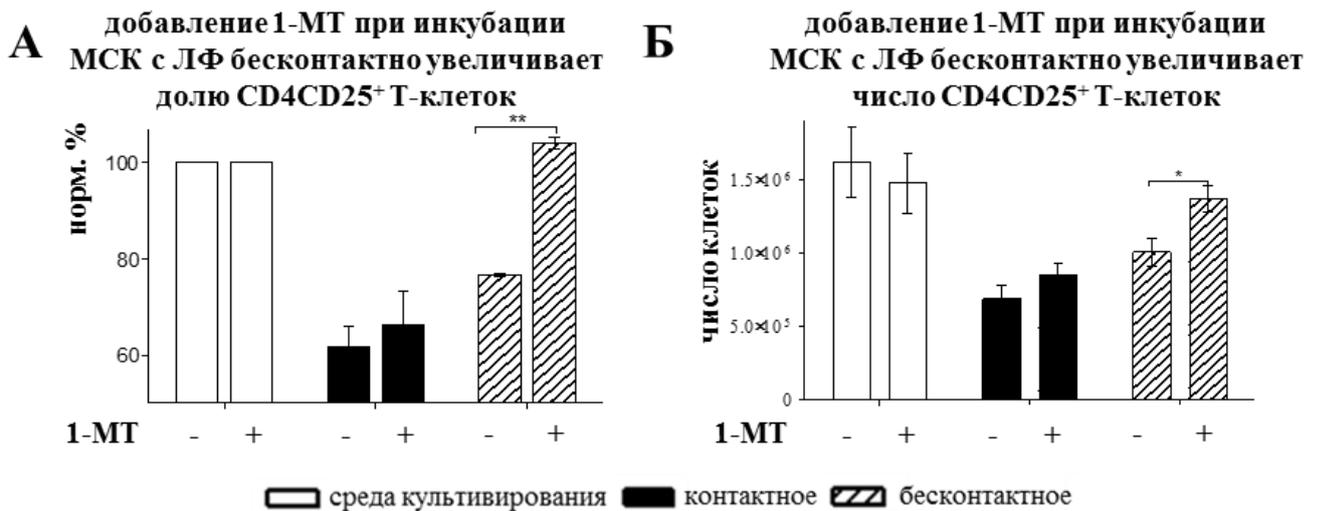


Рис. 16. Анализ влияния ферментативной активности IDO на иммуносупрессорную программу МСК (А) Оценка доли активированных CD4CD25⁺ лимфоцитов после инкубации с МСК в присутствии ингибитора IDO. (Б) Оценка общего числа лимфоцитов, после инкубации с МСК в присутствии ингибитора IDO. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=3$; * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни) 1-МТ - 1-метил-D,L-триптофан.

По нашим данным, основной причиной увеличения числа лимфоцитов, инкубируемых с МСК бесконтактным способом в присутствии 1-МТ, служит статистически достоверное

многократное снижение уровня кинуренина, так как подавление ферментативной активности IDO коррелировало с увеличением числа и доли CD4CD25⁺ лимфоцитов в бесконтактных условиях инкубации (Рис. 16А и Рис. 17А.). Однако подобных изменений мы не зарегистрировали в ходе контактной инкубации МСК и лимфоцитов, что, по нашим предположениям, подтверждает независимость от бесконтактной иммуносупрессии реализацию контактных механизмов подавления активности лимфоцитов.

Также мы установили, что в случае добавления 1-МТ, МСК увеличивают уровень экспрессии гена IDO как при контактном, так и бесконтактном способе инкубации с активированными лимфоцитами, однако на уровне белка увеличение удалось обнаружить только в бесконтактных условиях инкубации (Рис. 17Б-В.).

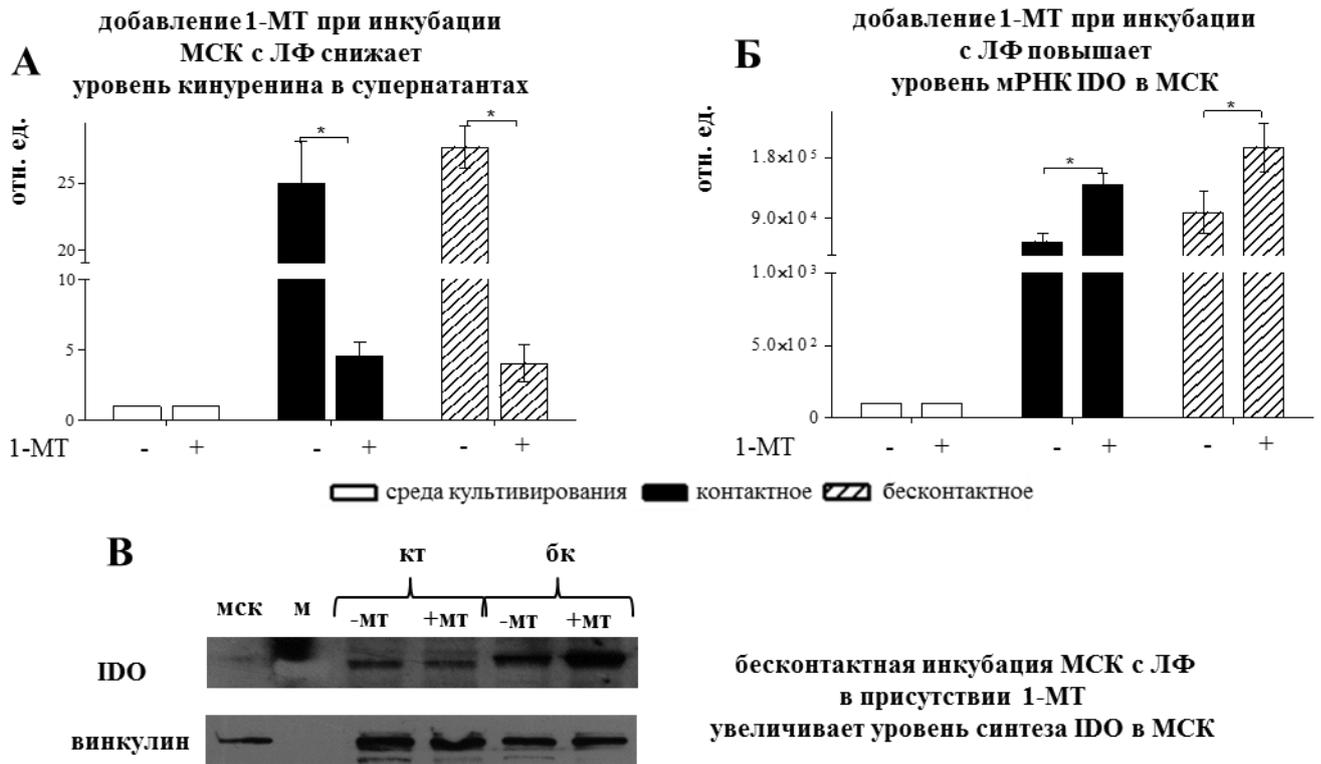


Рис. 17. Анализ влияния 1-МТ на иммуносупрессорную программу МСК. (А) Уровень кинуренина, измеренный методом ИФА, в полученных супернатантах. (Б) Уровень экспрессии гена IDO в МСК при добавлении 1-МТ. (В) Репрезентативные данные иммуноблоттинга с антителами против IDO тотальных лизатов МСК, полученных после инкубации с лимфоцитами в присутствии 1-МТ. Все данные (кроме иммуноблоттинга) представлены в виде $M \pm SEM$, $N=3$; * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни) МТ - 1-метил-D,L-триптофан, М – маркеры.

1.2.3 Анализ участия *iNOS* и его продукта *NO* в иммуносупрессорной программе МСК человека

В ходе транскрипционного анализа МСК были получены статистически достоверные данные по увеличению мРНК NOS2 в МСК при инкубации с активированными лимфоцитами. При этом профиль экспрессии гена NOS2 совпадал с таковым у гена IDO в МСК при различных условиях инкубации МСК со стимулированными и не стимулированными лимфоцитами (Рис. 18.).

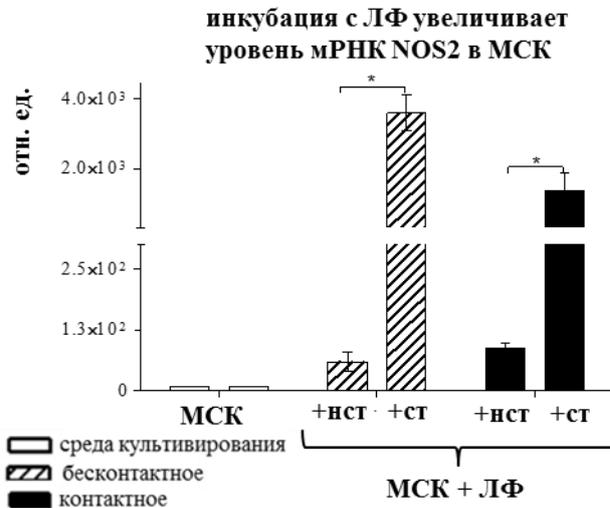


Рис. 18. Оценка уровня мРНК NOS2 в МСК после инкубации со стимулированными и не стимулированными лимфоцитами в различных условиях. (А) - Анализ уровня экспрессии гена NOS2 в МСК. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=6$; $*p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни) ст – стимулированные лимфоциты, нст – не стимулированные лимфоциты.

В связи с этим, мы решили установить, происходят ли изменения количества белка *iNOS*, кодируемого геном NOS2, и продукта его ферментативной активности *NO* при индукции иммуносупрессии МСК. Мы инкубировали МСК и активированные лимфоциты контактным и бесконтактным способом в присутствии ингибитора *iNOS* N^G -монометил-L-аргинина (L-NMMA). После инкубации оценивали долю активированных CD4CD25⁺ лимфоцитов. Однако, нам не удалось выявить изменений в увеличении доли CD4CD25⁺ лимфоцитов при инкубации с МСК в присутствии L-NMMA, по сравнению с контрольной группой (смешанная культура МСК и лимфоцитов без L-NMMA) (Рис. 19А.). Вполне возможно, что скорость действия *NO* и IDO значительно различаются по времени и нельзя исключать возможность, что мы не можем подобрать необходимое время для анализа, чтобы детектировать иммуносупрессорную активность *NO*. Тогда мы проанализировали содержание *NO* в супернатантах от смешанных культур МСК и активированных лимфоцитов при наличии и отсутствии L-NMMA в среде культивирования. Нам не удалось зарегистрировать изменения содержания *NO* при сравнении супернатантов от совместной инкубации МСК и лимфоцитов в присутствии и отсутствии L-NMMA (Рис. 19Б.) Мы также оценили количество *iNOS* на уровне белка в лизатах МСК, полученных после совместной инкубации с активированными и интактными лимфоцитами в присутствии L-

NMMA. Однако, мы не смогли детектировать белок iNOS в лизатах, несмотря на высокий уровень экспрессии гена NOS2 (Рис. 18 и Рис. 19В.).

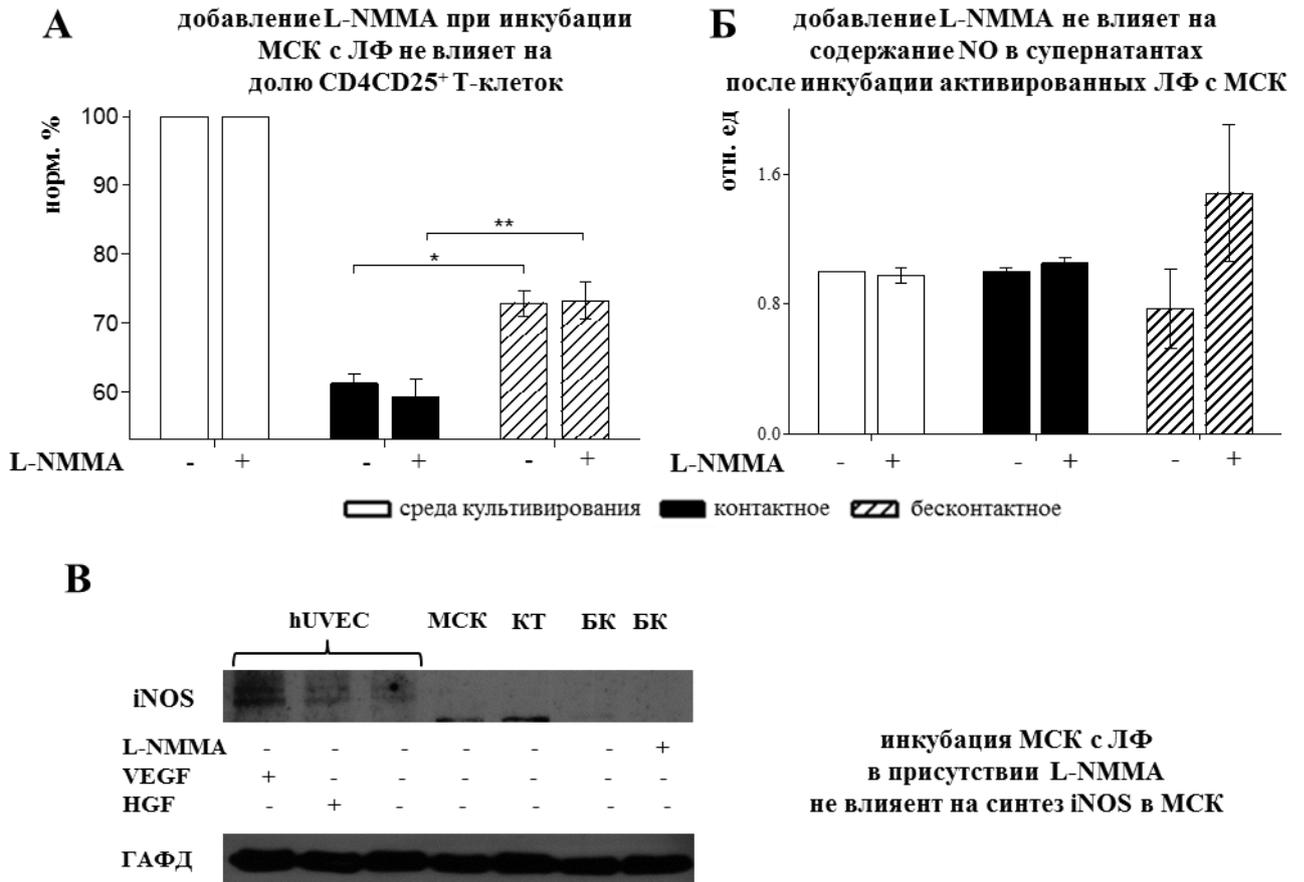


Рис. 19. Изучение вклада iNOS и его продукта NO в иммуносупрессорную программу МСК. (А) Оценка доли CD4CD25⁺ активированных лимфоцитов после инкубации с МСК в присутствии ингибитора iNOS (n=3, U-критерий Манна-Уитни). (Б) Уровень NO в супернатантах измеряли с помощью колориметрического набора реактивов, данные представлены в виде $M \pm SEM$, N=3; (* p < 0,05; ** p < 0,01). (В) Репрезентативные данные иммуноблоттинга с антителами против iNOS тотальных лизатов МСК, инкубируемых с лимфоцитами в присутствии ингибитора iNOS L-NMMA - N^G-монометил-L-аргинина. В качестве контролей использовали клетки линии hUVEC, инкубируемые с VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) и HGF (фактор роста гепатоцитов) концентрацией 25 нг/мл в течение 20 часов. ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, КОНТ – контактная инкубация, БЕЗ КОНТ – бесконтактная инкубация.

Таким образом, мы установили, что при взаимодействии МСК с лимфоцитами в МСК возрастает уровень транскрипционной активности гена NOS2 (уровень мРНК). Это увеличение не приводит к увеличению уровня белка iNOS, а также к продукции значимых для иммуносупрессии количеств NO.

2. Изучение роли контактных взаимодействий в иммунорегулирующей программе МСК

2.1 Контактная инкубация приводит к увеличению мРНК и уровня белка ICAM-1 в МСК

Согласно нашим и литературным данным [64, 74], МСК сильнее супрессируют лимфоциты при контакте с ними, по сравнению с бесконтактными условиями. При этом мы наблюдали поверхностное взаимодействие между МСК и лимфоцитами, что вероятно говорило об установлении контактов между двумя группами клеток (см с 76 Рис. 10, с 78 Рис. 12А.).

В современной литературе собрано большое количество данных, показывающих участие контактных механизмов иммуносупрессии, реализуемых с МСК, однако они изучены хуже, чем действие секретируемых молекул. Принято считать, что контактная иммуносупрессия – это отдельная иммуносупрессорная программа, отличная от действия растворимых молекул, которая имеет собственную систему регуляции, состоит из нескольких молекулярных механизмов и вносит дополнительный вклад в иммуносупрессию, реализуемую МСК [195]. Условно контактные взаимодействия можно разделить на несколько групп: рецептор/лиганд, инициирующие анергию Т-клеток PD-1/PD-L1, индукция апоптоза с помощью Fas/FasL [12, 167] и молекулы адгезии [195].

Мы проанализировали условия иммуносупрессии лимфоцитов под действием МСК. При инкубации с МСК мы не обнаружили статистически значимых изменений в спонтанном апоптозе активированных лимфоцитов по сравнению с контролем, что ставило под сомнение участие Fas/FasL в контактной иммуносупрессии. Известно, что реализация иммуносупрессии МСК на лимфоциты с использованием взаимодействий рецептор/лиганд PD-1/PD-L1 связана, в основном, с направленным негативным влиянием на Th17 лимфоциты, которые составляют незначительную долю ЛПК [47, 167]. Поэтому мы пришли к выводу, что именно молекулы адгезии с большой вероятностью могут играть важную роль в иммуносупрессии, так как они принимают участие в миграции лимфоцитов и процессе презентации антигена [58, 101] Тем более, что участие молекул адгезии продемонстрировано в случае иммуносупрессорных механизмов мышинных МСК на схожей экспериментальной модели *in vitro* [228]. Опираясь на эти данные, мы проанализировали изменение профилей экспрессии в МСК мРНК нескольких молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1, селектинов и кадгеринов) при инкубации с активированными лимфоцитами.

В результате было установлено, что при совместной инкубации с активированными и интактными Т-клетками, в МСК многократно возрастает уровень мРНК ICAM1 (Рис. 20А.). Но уровень экспрессии гена, не всегда коррелирует с уровнем кодируемого им белка. Поэтому мы провели анализ уровня ICAM-1 на поверхности МСК при инкубации с активированными и интактными лимфоцитами и обнаружили высокий уровень ICAM-1 на поверхности МСК. Однако при инкубации со стимулированными Т-клетками уровень ICAM-1 на МСК был максимальным, по сравнению с контролем (МСК без лимфоцитов) (Рис. 20 Б-В.).

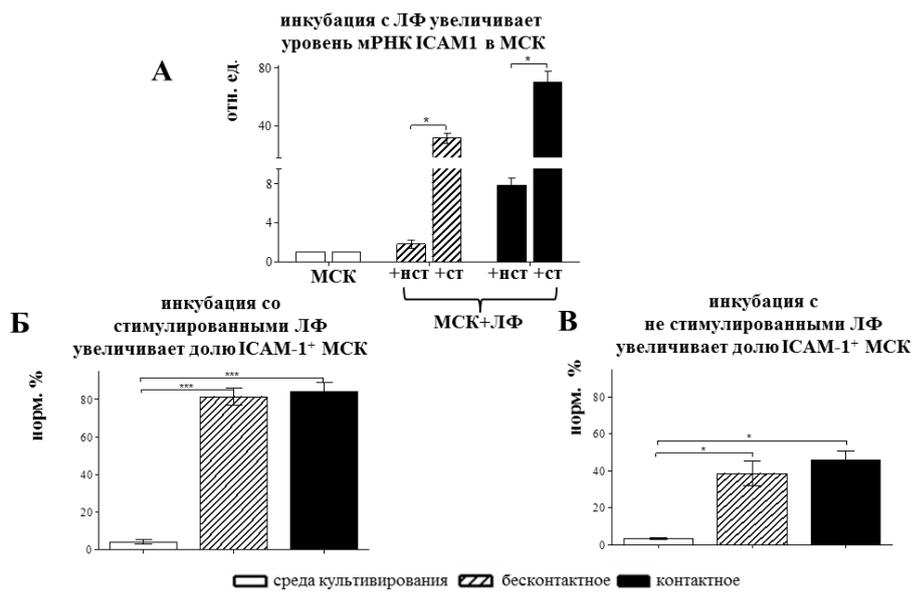


Рис. 20. Изменение уровня ICAM-1 в МСК при инкубации со стимулированными и не стимулированными лимфоцитами. (А) Данные уровня экспрессии гена ICAM1 в МСК; $M \pm SEM$, $N=4$ (U-критерий Мана-Уитни). (Б) и (В) Анализ доли ICAM-1+ МСК, по сравнению с контролем, $N=4$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (множественное сравнение выборок против контроля, тест Даннета) ICAM-1 –

межклеточная молекула адгезии 1 типа, ст – стимулированные лимфоциты, нст – не стимулированные лимфоциты.

Похожие результаты получены при инкубации МСК с очищенной популяцией CD4+ Т-хелперов (Рис. 21.)

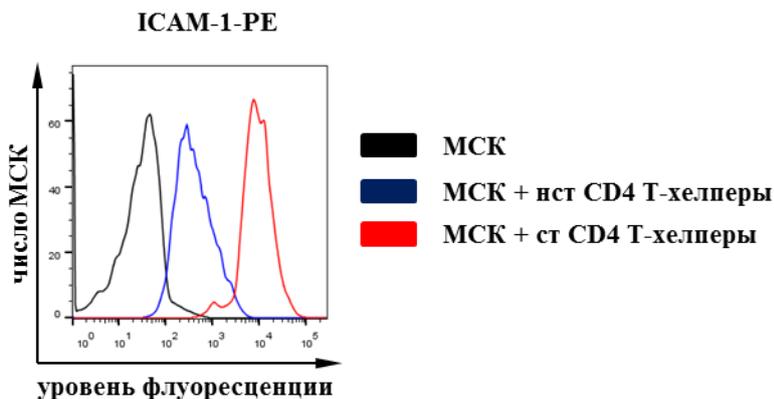


Рис. 21. Изменение уровня ICAM-1 в МСК при инкубации с очищенными популяциями стимулированных и не стимулированных CD4 Т-хелперов. Репрезентативные гистограммы сравнения процента ICAM-1+ МСК при инкубации с очищенными CD4 лимфоцитами относительно контроля.

То есть, присутствие лимфоцитов, независимо от их степени активации, вызывает у МСК ответ в виде появления молекул ICAM-1 на клеточной поверхности, тогда как в

контрольных образцах МСК эту молекулу на своей поверхности не несут. Нам не удалось зарегистрировать статистически значимых изменений VCAM-1 в МСК, как на поверхности клеток, так и на уровне мРНК. (Рис. 22.). Данное наблюдение может свидетельствовать в пользу того, что МСК различных видов реализуют контактную иммуносупрессию, используя разные молекулы адгезии.

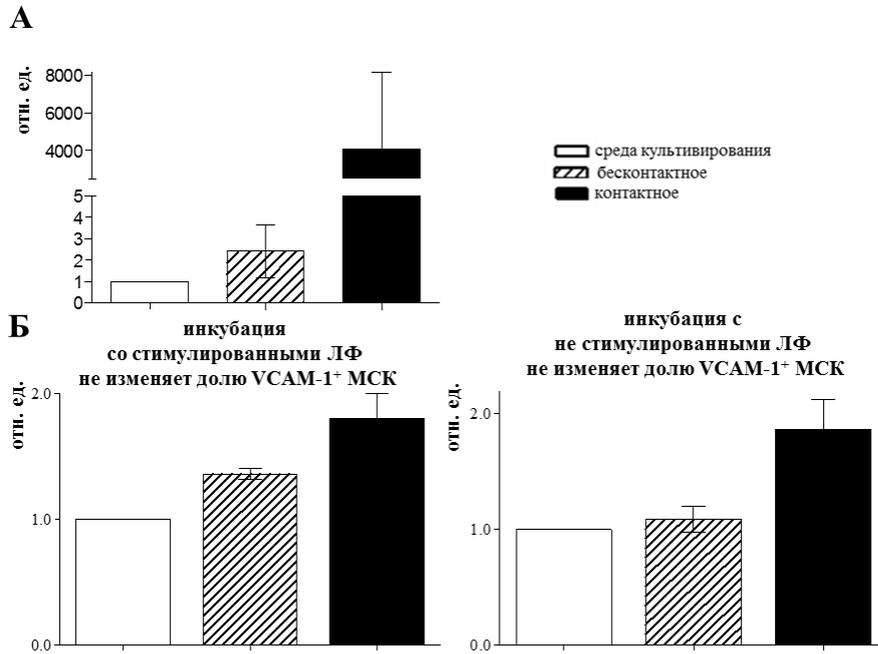


Рис. 22. Изменение уровня VCAM-1 в МСК при инкубации с активированными и не стимулированными лимфоцитами. (А) Данные уровня экспрессии гена VCAM1 в МСК при инкубации с активированными лимфоцитами; $M \pm SEM$, $N=4$. (Б) и (В) Анализ доли VCAM-1⁺ МСК, по сравнению с контролем, при инкубации со стимулированными и не стимулированными лимфоцитами, $N=4$. VCAM-1 – молекула клеточной адгезии сосудов 1.

2.2 МСК регулируют активность лимфоцитов, изменяя уровень ICAM-1 на их поверхности

ICAM-1 является молекулой, содержащей пять иммуноглобулиноподобных доменов. Из литературы известно, что ICAM-1 принимает участие в активации лимфоцитов, в частности, было показано, что взаимодействие наивных Т-клеток с антителами против CD3 в комбинации с иммобилизованными молекулами ICAM-1 приводит к более сильной стимуляции Т-клеток. По-видимому, клетки, помимо сигнала от ТКР, ко-стимуляторных молекул и цитокинов (IL-2), получают дополнительный сигнал при взаимодействии ICAM-1 и LFA-1 на поверхности лимфоцитов. Однако блокировка LFA-1 не влияла на активацию Т-клеток [46]. Мы предположили, что эффект ICAM-1 можно объяснить гомофильными контактами между ICAM-1 на поверхности МСК и ICAM-1 лимфоцитов. Мы определили изменения уровня ICAM-1 лимфоцитов при их контакте с МСК. Для этого мы оценили изменения в ICAM-1 у интактных и активированных лимфоцитов на уровне мРНК и на уровне белка после инкубации с МСК.

Мы обнаружили, что в контактных условиях не стимулированные лимфоциты на появление МСК отвечают увеличением уровня мРНК ICAM1, а уровень экспрессии гена ICAM1 активированных лимфоцитов значительно выше по сравнению с не активированными (Рис. 23А.). Однако при анализе уровня ICAM-1 на поверхности лимфоцитов мы обнаружили, что в то же самое время МСК снижают долю и число ICAM-1⁺ клеток среди активированных Т-хелперов и способствуют увеличению доли и числа ICAM-1⁺ клеток у интактных лимфоцитов, причем максимальный эффект достигается при наличии контактов между МСК и лимфоцитами (Рис. 23Б-В.).

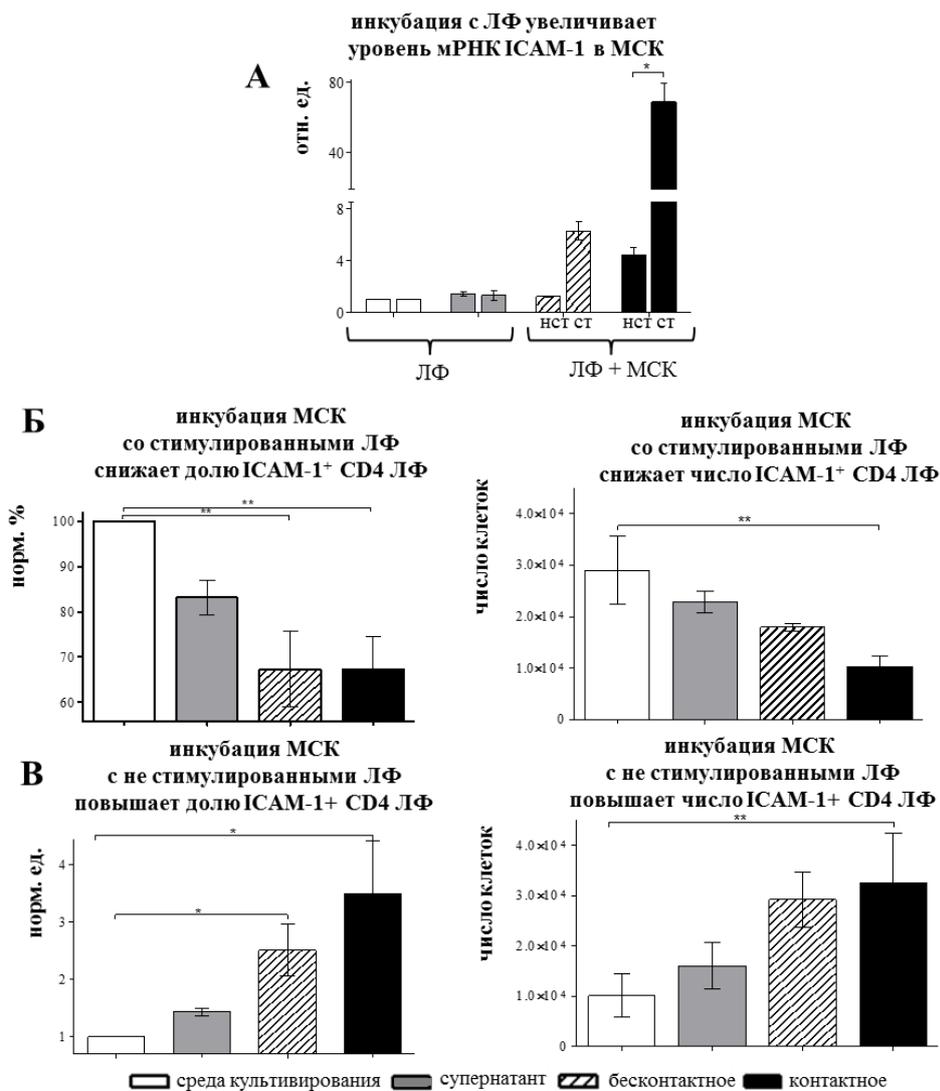


Рис. 23. Изменение уровня ICAM-1 в стимулированных и не стимулированных лимфоцитах при совместной инкубации с МСК. (А) Изменение транскрипционной активности гена ICAM-1 в лимфоцитах, представлены средние значения содержания мРНК в относительных единицах \pm сос, N=4. (U-критерий Мана-Уитни). Доля и число клеток, несущих ICAM-1 на поверхности не стимулированных (Б) и стимулированных (В) CD4 лимфоцитов. Данные представлены в виде $M \pm SEM$; N=6 (Б) - попарное сравнение методом Шидока-Холма, (В) - (тест на нормальность не пройден $p < 0,05$ од-

нофакторный дисперсионный анализ на рангах Крускала – Уоллиса с последующим тестом Тьюки) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Данные были подтверждены и на очищенной популяции CD4 Т-клеток (Рис. 24.).

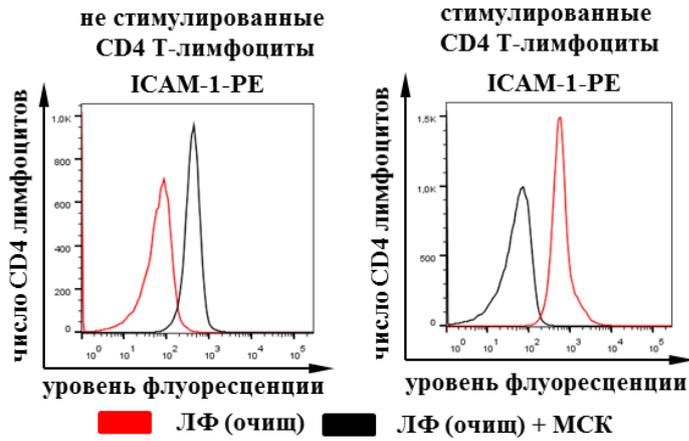
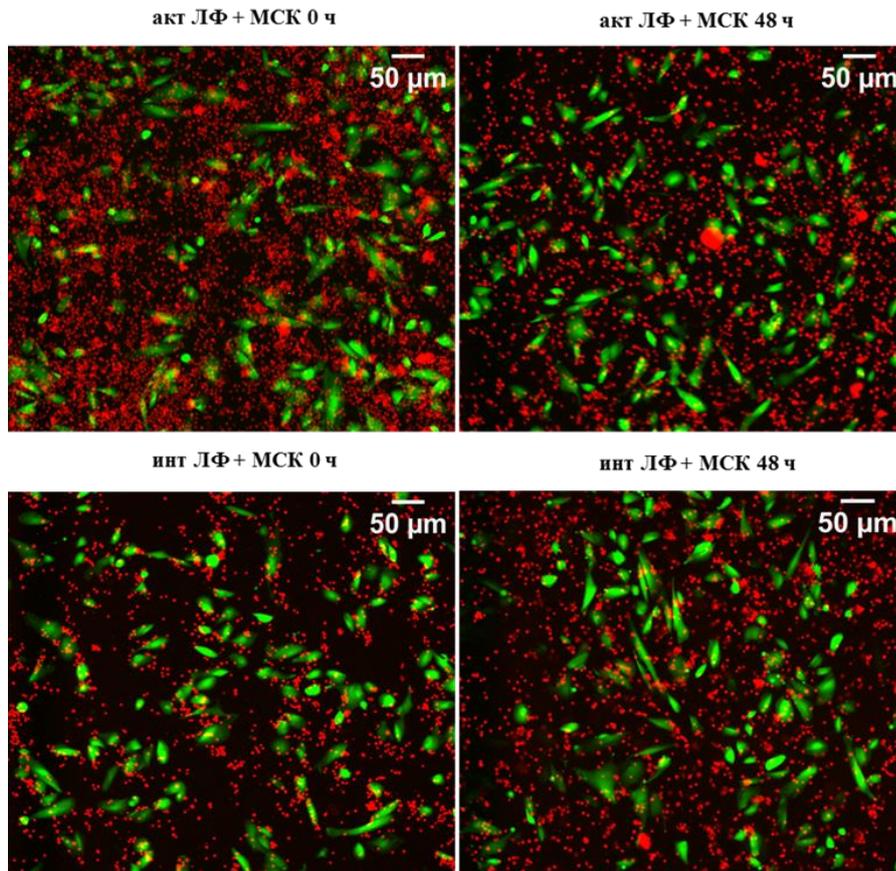


Рис. 24 - Изменение уровня ICAM-1 на поверхности стимулированных и не стимулированных очищенных CD4 Т-клеток при контактной инкубации с МСК. Репрезентативные гистограммы сравнения процента очищенных CD4ICAM-1⁺ лимфоцитов при инкубации с МСК относительно контроля (CD4 лимфоциты, инкубируемые отдельно) одного из трех экспериментов.

В случае инкубации с МСК стимулированных лимфоцитов снижение уровня ICAM-1 на поверхности Т-клеток коррелировало с данными по изменению в уровне CD25, полученными ранее (см с 78 Рис. 13Б и с 89 Рис. 23Б.). Данный факт позволяет предположить участие контактного взаимодействия между молекулами ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов в иммуносупрессии. Однако инкубация МСК с не стимулированными Т-клетками приводит к увеличению уровня ICAM-1 на поверхности Т-хелперов, а также увеличению пропорции CD4ICAM-1⁺ лимфоцитов (Рис. 24В.). При этом максимальный эффект проявляется в контактных условиях инкубации. Это увеличение уровня ICAM-1 на поверхности МСК возможно необходимо



для поддержки выживания не стимулированных лимфоцитов (Рис. 25), описанного в литературе [23].

Рис. 25. Контактная инкубация с МСК снижает число активированных лимфоцитов и поддерживает выживание интактных лимфоцитов. Микрофотографии (флуоресценция) инкубации МСК (Calcein Green, AM) и ЛФ (Calcein Red-Orange, AM) контактным способом в начале и через 48 ч, 10х увеличение.

2.3 Уровень мРНК ICAM1 в МСК и лимфоцитах возрастает под действием супернатанта после совместной инкубации МСК и Т-клеток

В ходе изучения механизмов контактной иммуносупрессии мы обнаружили статистически значимое увеличение уровня мРНК ICAM1 в МСК и лимфоцитах не только при контактной инкубации, но и в условиях отсутствия контактов между двумя типами клеток (см с 87 Рис. 20А и с 89 Рис. 23А.), что предполагает важность обмена растворимыми молекулами между МСК и лимфоцитами для индукции ICAM-1. Мы предположили, что в ходе такого обмена между МСК и лимфоцитами происходит инициация экспрессии гена ICAM1 в МСК и лимфоцитах. Мы инкубировали МСК с активированными лимфоцитами, а через 48 часов собрали супернатанты (от клеток, находившихся в контактных и бесконтактных условиях) и добавили к не стимулированным МСК и интактным лимфоцитам, культивируемым отдельно. В результате инкубации с этими супернатантами происходило сильное повышение уровня мРНК ICAM1 и в лимфоцитах, и в МСК. При этом стоит отметить, что добавление супернатанта, полученного после контактной иммуносупрессии, повышает уровень экспрессии гена ICAM1 значительно сильнее, чем супернатант от бесконтактных культур в обоих типах клеток (Рис. 26.).

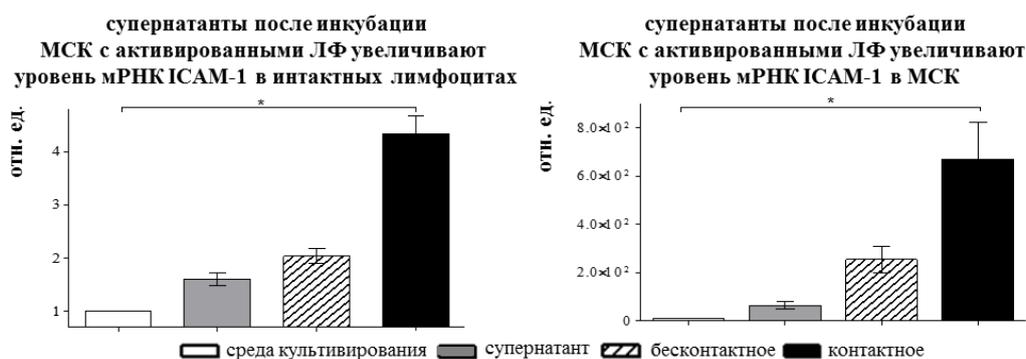


Рис. 26. Изменения уровня экспрессии гена ICAM1 в не стимулированных МСК и лимфоцитах при добавлении супернатантов от совместной инкубации МСК и

стимулированных лимфоцитов. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=3$ (множественное сравнение выборок против контроля; * $p < 0,05$).

2.4 ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов необходим для реализации контактной иммуносупрессии

Мы обнаружили, что при образовании контактов между МСК и активированными лимфоцитами негативное влияние МСК на активацию и пролиферацию Т-клеток сильно зависит от ICAM-1 на поверхности Т-клеток и МСК. Вероятно, ICAM-1 за счет гомофильных взаимодействий, способен проводить внутрь Т-клетки сигнал, который негативно влияет на активацию и пролиферацию Т-клеток. Мы предположили, что контакты моле-

кул ICAM-1 на поверхности МСК и активированных лимфоцитов друг с другом и с другими белками на поверхности клеток необходимы для наблюдаемого нами иммуносупрессорного эффекта. Мы использовали блокирующие специфические антитела против ICAM-1. Моноклональные антитела SC-107L (SantaCruz), согласно литературе [280], способны препятствовать связыванию ICAM-1 с его лигандами. Мы оценили долю лимфоцитов, которые после инкубации с МСК несли на своей поверхности CD25 в очищенной популяции Т-хелперов в присутствии контрольных антител (мышиный IgG1) или блокирующих антител против ICAM-1. По нашим ожиданиям, блокировка ICAM-1 на поверхности клеток должна была привести к увеличению уровня маркера CD25 (IL2RA).

По нашим данным, блокировка ICAM-1 на поверхности клеток при совместной инкубации МСК с активированными лимфоцитами (очищенная популяция CD4 Т-клеток) приводит к значительному увеличению уровня CD25 на поверхности активированных лимфоцитов (Рис. 27А.), а также общего числа CD25⁺ Т-хелперов, что свидетельствует о снижении иммуносупрессорного действия МСК (Рис. 27Б. и Рис. 28.).

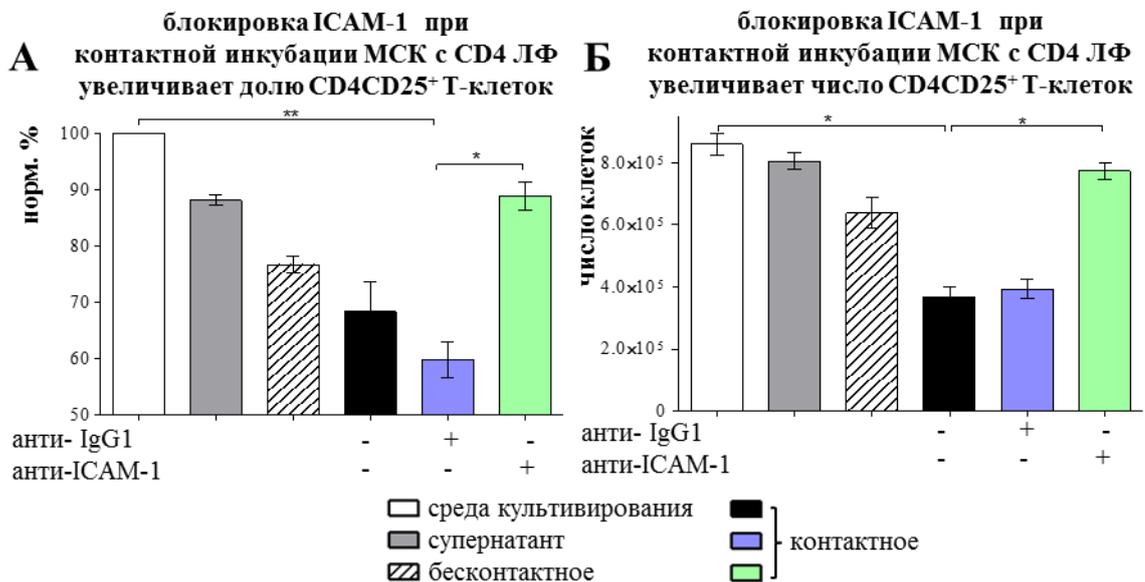


Рис. 27. Поверхностная блокировка ICAM-1 при совместной инкубации МСК и активированных CD4 Т-клеток ослабляет иммуносупрессорное действие МСК. (А) Доля и (Б) число CD4CD25⁺ Т-клеток после инкубации с МСК в условиях блокировки ICAM-1 на поверхности клеток, данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=6$ (нормированные % доли CD25 однофакторный дисперсионный анализ на рангах Крускала – Уоллиса с последующим тестом Тьюки), (число лимфоцитов множественное сравнение выборок против контроля, тест Даннета) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

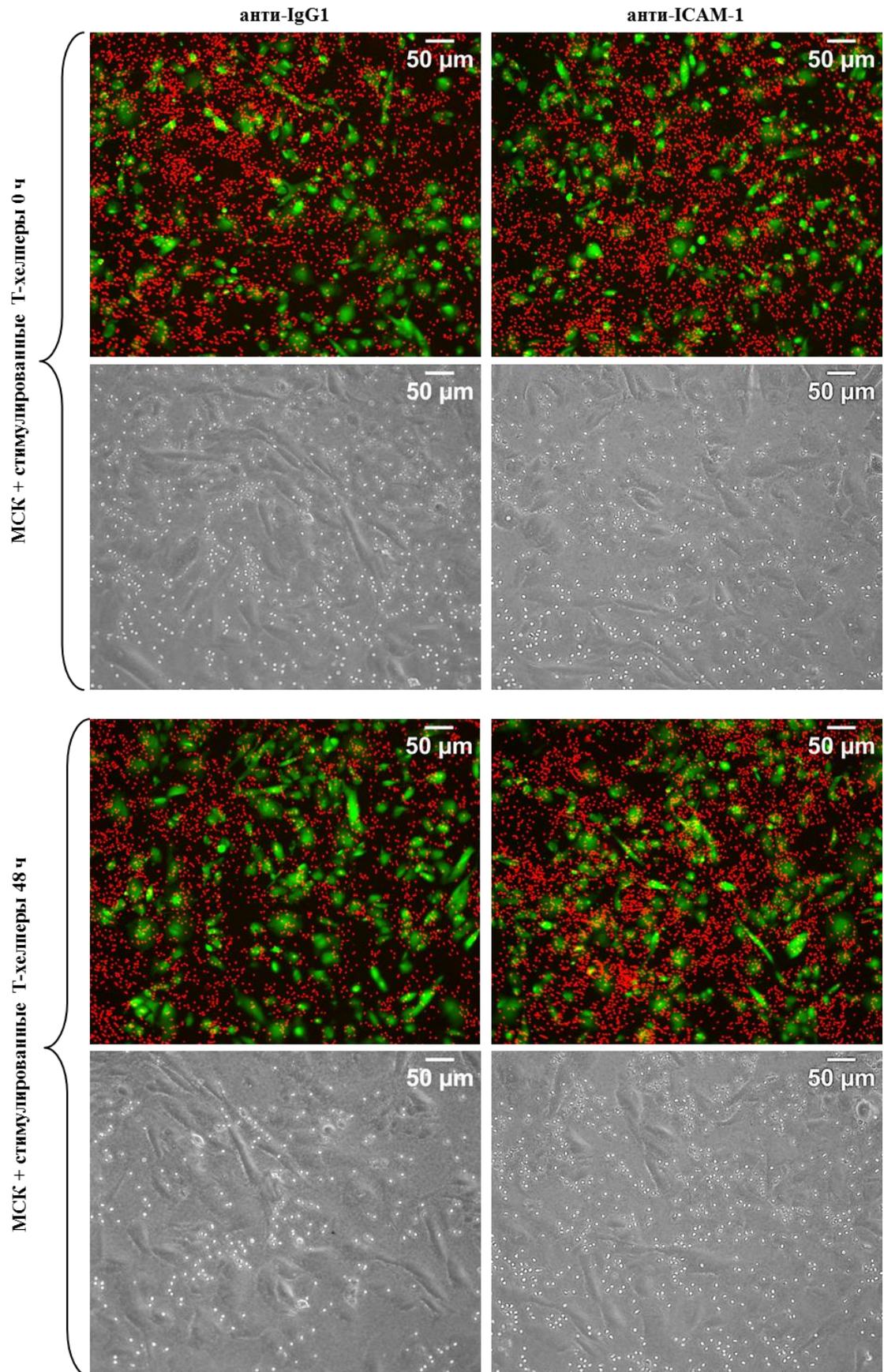


Рис. 28. Блокировка ICAM-1 на поверхности М2К и стимулированных Т-хелперов снижает иммуносупрессорное влияние М2К. Микрофотографии активированных (антителами против CD3 и CD28) Т-хелперов при контактной инкубации с М2К (10х - флуоресценция, 20х – фазовый контраст) в начале и через 48 часов.

2.5 Блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов не влияет на бесконтактную иммуносупрессию, реализуемую через IDO

Анализируя данные по блокировке ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов, мы обратили внимание на тот факт, что, судя по результатам определения доли Т-хелперов, несущих на своей поверхности CD25, а также подсчета числа CD4 лимфоцитов в условиях блокировки ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов, полного подавления иммуносупрессорной активности МСК не происходит (см с 92 Рис. 27А-Б.). Это может свидетельствовать о том, что бесконтактная иммуносупрессия не связана с блокировкой ICAM-1 на поверхности МСК. В связи с этим, мы решили оценить активность IDO в условиях ингибирования. Мы инкубировали МСК и стимулированные очищенные CD4 Т-клетки контактным способом в присутствии блокирующих антител к ICAM-1, после чего проанализировали в супернатантах от совместной инкубации содержание кинуренина, а в лизатах МСК мРНК IDO и соответствующий белковый продукт. Согласно результатам, блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и стимулированных CD4 Т-клеток не приводила к изменению содержания кинуренина в супернатанте от контактной инкубации, по сравнению с контрольным супернатантом от контактной инкубации, в который добавили контрольный иммуноглобулин. Также содержание кинуренина в этих супернатантах соответствовало содержанию кинуренина в супернатанте от бесконтактной инкубации (Рис. 29А.). Анализ изменения IDO в лизатах МСК после совместной инкубации с лимфоцитами в различных условиях также не выявил различий в уровне мРНК IDO и белка IDO при сравнении контактной инкубации с блокирующими антителами против ICAM-1 и без (Рис. 29Б-В.). Полученный результат позволяет утверждать, что контактная иммуносупрессия (во всяком случае, зависящая от ICAM-1) не влияет на продукцию растворимых факторов, таких как IDO, реализующих механизмы бесконтактной иммуносупрессии.

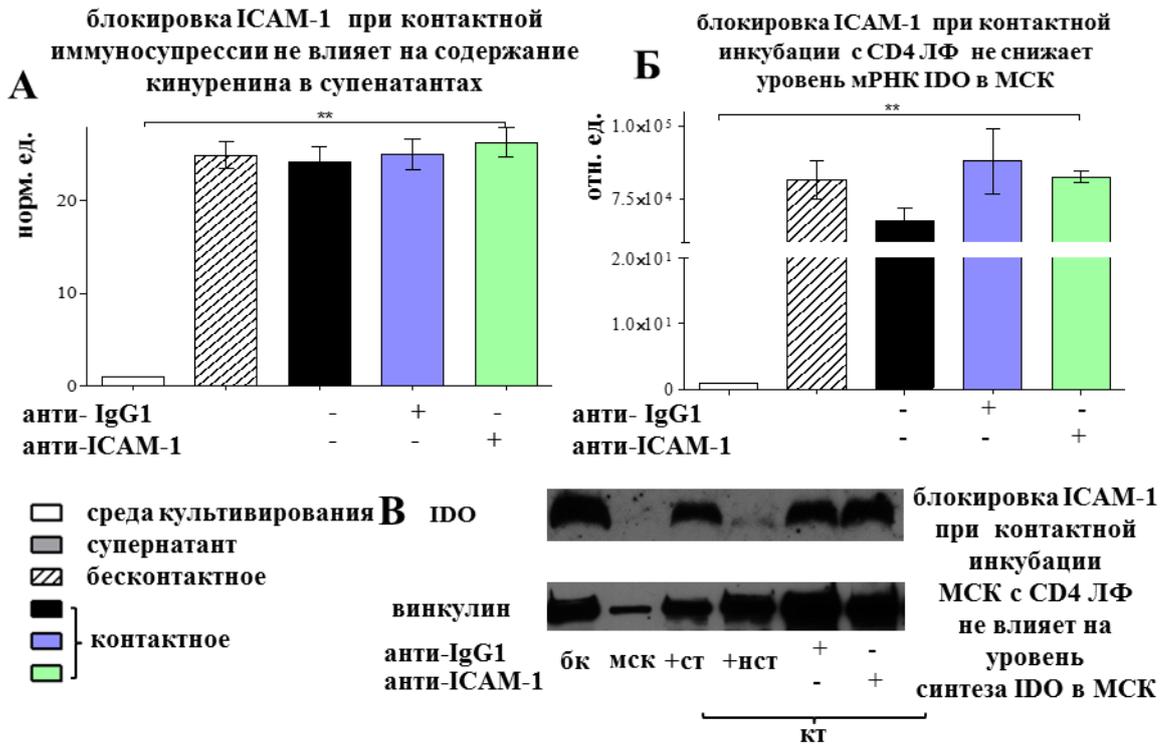


Рис. 29. Поверхностная блокировка ICAM-1 при совместной инкубации МСК и стимулированных CD4 Т-клеток не снижает уровень и активность IDO. (А) – Содержание кинуренина и (Б) уровень мРНК IDO, $M \pm SEM$, $N=6$; $** p < 0,01$; однофакторный дисперсионный анализ на рангах Крускала – Уоллиса с последующим тестом Даннета) (В) Данные регистрации иммуноблоттинга, регистрирующего люминесценцию антител против IDO в тотальных лизатах МСК, полученных при инкубации с лимфоцитами в присутствии блокирующих антител на ICAM-1 (IgG1), в качестве контроля использовали антитела на мышинный IgG1. СТ – стимулированные лимфоциты, НСТ – не стимулированные лимфоциты, БК – бесконтактная инкубация.

3. Изучение свойств МСК, поддерживающих выживание Т-клеток

3.1 Поддержка лимфоцитов за счет МСК зависит от соотношения клеток

Если раньше считали, что МСК способны оказывать только иммуноподавляющее действие, то сейчас в литературе все чаще встречаются данные об их способности поддерживать выживание лимфоцитов. Например, было установлено, что мышинные МСК в условиях недостаточной активации Т-клеток или их малого количества способствуют выживанию и усиливают пролиферацию лимфоцитов, но при этом продолжают блокировать пролиферацию полностью активированных Т-клеток *in vitro* [150]. Принято считать, что ответ МСК зависит от микроокружения и, видимо, определенного баланса между воспалительными и противовоспалительными факторами. Так было продемонстрировано, что предварительная инкубация МСК с избытком IFN- γ и TNF- α (условия воспаления) полностью блокирует поддержку лимфоцитов. [150]. Другие исследователи показали, что в

присутствии иммуносупрессанта, циклоспорина А, введение МСК крысам с пересаженным сердцем приводило к его скорейшему отторжению [117]. Таким образом, результаты исследований позволяют предположить, что МСК регулируют баланс активности иммунных клеток, позволяя им находиться постоянно в режиме готовности к ответу, и, в зависимости от условий микроокружения, управляют воспалительным процессом в сторону его усиления или наоборот - угнетения [26].

Изучая иммуносупрессирующие свойства МСК, мы, так же как и другие исследователи, [150, 310] показали, что в условиях низких соотношений между клетками (1/10) МСК способствуют выживанию активированных лимфоцитов, а не блокируют их пролиферацию. (Рис. 30.).

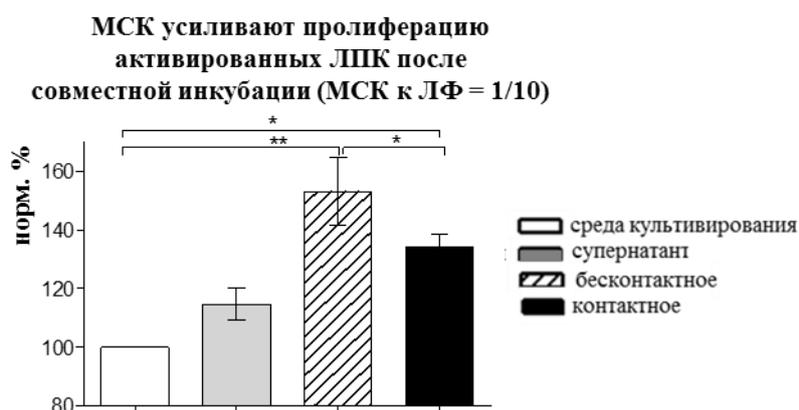


Рис. 30. Оценка пролиферации активированных (ФГА 10 мкг/мл) лимфоцитов в составе ЛПК при совместной инкубации с МСК; данные представлены как $M \pm SEM$, $N=3$ (тест на Нормальность Шапиро-Уилка $p = 0,052$; попарное сравнение методом Шидока-Холма * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Зарегистрировав эффект поддержки активации Т-клеток со стороны МСК при соотношении МСК к лимфоцитам 1 к 10, мы задались вопросом, как МСК будут взаимодействовать с интактными не стимулированными лимфоцитами.

3.2 Поддержка лимфоцитов за счет МСК максимальна в контактных условиях и коррелирует с увеличением уровня CD25 на интактных CD4 Т-клетках

Инкубация очищенной популяции интактных CD4 лимфоцитов с МСК уже на вторые сутки приводит к увеличению уровня CD25 на поверхности интактных лимфоцитов, что также подтверждается увеличением числа Т-клеток, несущих CD25, культивируемых в присутствии МСК, по сравнению с контролем (Рис. 31.). При этом полученные результаты позволяют предположить, что в механизмах поддержки лимфоцитов МСК задействованы, как бесконтактные механизмы, так и контактные взаимодействия.

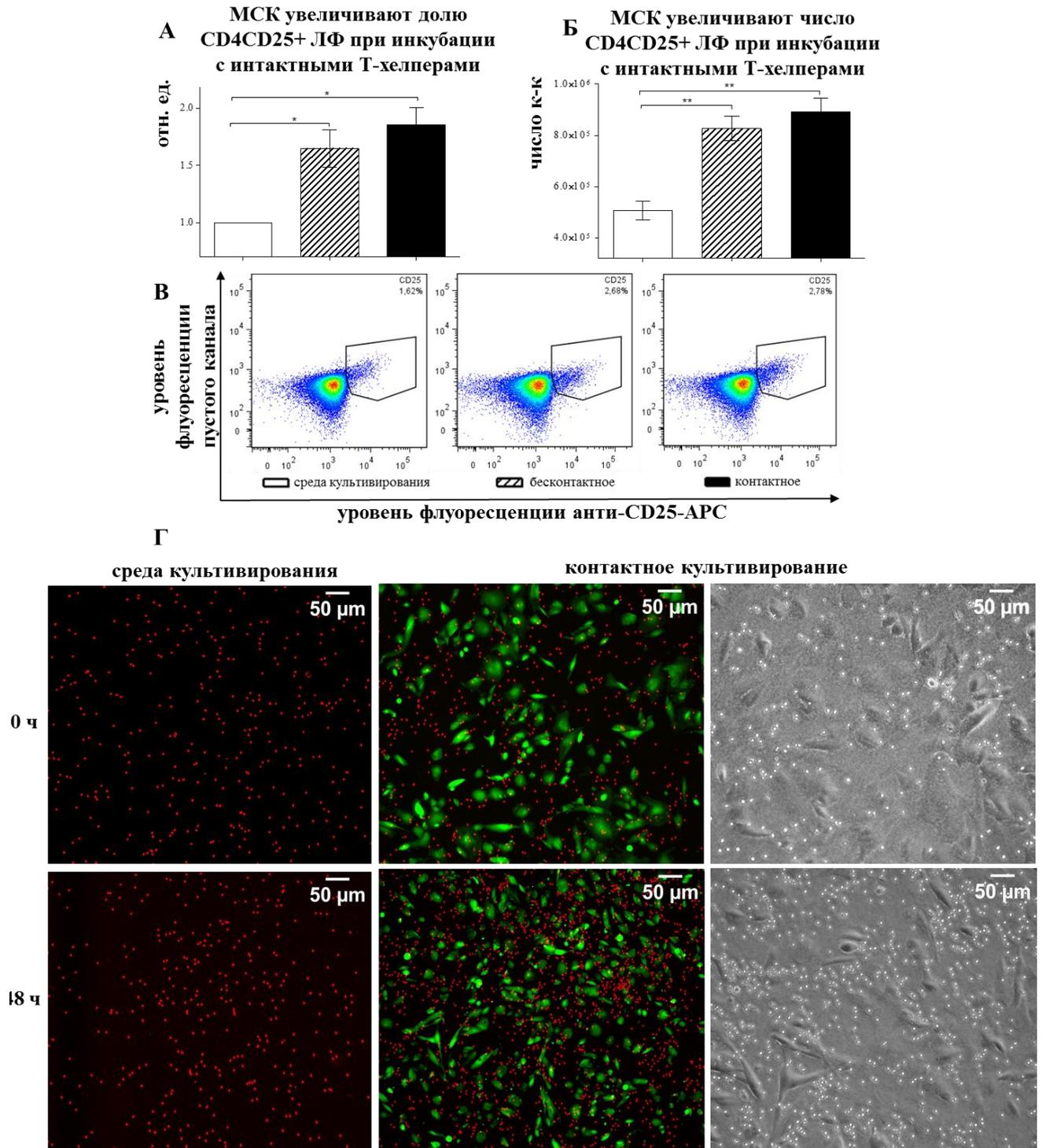


Рис. 31. Инкубация интактных CD4 Т-клеток с МСК способствует их выживанию. (А). Доля (однофакторный дисперсионный анализ на рангах Крускала – Уоллиса с последующим тестом Тьюки) и число (Б) интактных CD4CD25⁺ Т-клеток (тест на нормальность Шапиро-Уилка $p = 0,780$ с последующим тестом Даннета; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.), после инкубации с МСК, $M \pm SEM$, $N=5$. (В) Репрезентативные данные 2D графиков флуоресценции интактных CD4CD25⁺ Т-клеток, против флуоресценции в пустом канале. (Г) Микрофотографии культур интактных Т-клеток в среде культивирования и в условиях контактов с МСК в начале и после 48 часов инкубации (флуоресценция 10x увеличение, фазовый контраст 20x увеличение).

3.3 ICAM-1 на поверхности МСК участвует в поддержке выживания лимфоцитов

Анализируя взаимодействия МСК с не стимулированными лимфоцитами, мы установили, что МСК действительно способствуют выживанию интактных лимфоцитов, как в составе ЛПК, так и в очищенной популяции Т-хелперов. Оставался невыясненным вопрос, за счет чего происходит поддержка выживания интактных Т-хелперов с помощью МСК? Мы проанализировали данные по контактной инкубации МСК и интактных лимфоцитов и обратили внимание, что МСК увеличивают уровень ICAM-1 на интактных лимфоцитах (см с 89 Рис. 23В.). Наличие этой молекулы на поверхности интактных лимфоцитов при контактах с МСК коррелировало с незначительным, но достоверным увеличением уровня CD25 на лимфоцитах (Рис. 31А.). Более того и на самих МСК уровень ICAM-1 возрастал при инкубации с интактными Т-клетками, по сравнению с контролем (МСК, инкубируемые отдельно) (см с 87 Рис. 20В.). Тогда мы предположили, что, возможно, в поддержке выживания лимфоцитов также может играть роль ICAM-1, при этом необходимы именно взаимодействия молекул на поверхности клеток. Для проверки нашей гипотезы мы инкубировали МСК и интактные очищенные CD4 Т-клетки контактным способом в присутствии блокирующих антител против ICAM-1. Блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов снижала уровень CD25 на поверхности Т-клеток до уровня контроля (интактные Т-лимфоциты, инкубируемые отдельно). Таким образом, наши данные подразумевают, что наблюдаемый нами эффект поддержки выживания лимфоцитов с помощью МСК требует участия ICAM-1 на поверхности клеток (Рис. 32.).

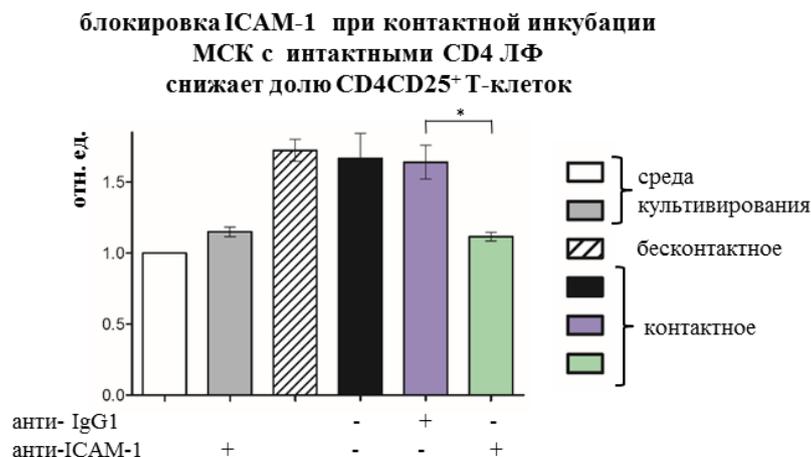


Рис. 32. Блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и интактных CD4 Т-клеток при совместной инкубации отменяет способность МСК повышать уровень CD25 на поверхности Т-клеток. Доля интактных CD4CD25⁺ Т-хелперов (очищенная популяция) после инкубации с МСК в присутствии блокирующих антител против ICAM-1. Данные представлены как $M \pm SEM$, $N=4$ (однофакторный дисперсионный анализ на рангах Крускала – Уоллиса с последующим тестом Тьюки, * $p < 0,05$).

Таким образом, можно сделать вывод, что ICAM-1 является важной молекулой в иммунорегулирующих процессах МСК и в зависимости от условий микроокружения может реализовывать либо супрессию Т-клеток, либо поддерживать их выживание. Более того наличие ICAM-1 на поверхности Т-клеток, по-видимому, обеспечивает дополнительные сигналы для их активации и выживания.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реализация иммунорегулирующей программы МСК зависит от условий микроокружения. Изучение этих условий в рамках моделей *in vivo* не всегда является эффективным за счет большого количества влияющих друг на друга факторов. Мы попытались в нашей работе свести это количество факторов к минимуму, выявляя и изучая иммунорегулирующие эффекты МСК на лимфоциты с помощью системы совместной инкубации *in vitro*. В качестве источника МСК использовали жировую ткань, в связи с большим иммуносупрессорным потенциалом полученных из нее клеток, по сравнению с МСК костного мозга или пуповины [229]. Возможно, повышенный иммуносупрессорный потенциал этих МСК связан со склонностью жировой ткани к развитию воспаления [201]. Клетками-мишенями в описанной системе были CD4 Т-лимфоциты в составе тотальной популяции ЛПК, либо выделенные в виде очищенной популяции с помощью сортировки.

В ходе данной работы были обнаружены следующие факты:

1. При активации Т-клеток МСК оказывают иммуносупрессорное действие на CD4 лимфоциты, которое проявляется в подавлении их пролиферации, связанном со снижением поверхностного уровня CD25 у Т-клеток.
2. Активация иммуносупрессорной программы МСК не приводит к изменению уровня таких фенотипических маркеров, как CD90 (заякоренный белок с варибельным им-мунноглобулиноподобным доменом), CD105 (эндоглин), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза).
3. Бесконтактная и контактная инкубация МСК и активированных лимфоцитов приводит к иммуносупрессии Т-клеток, опосредуемой активностью индоламин-2,3-диоксигеназы - IDO.
4. Молекула межклеточной адгезии ICAM-1 важна для контактной иммуносупрессии, реализуемой МСК, и не влияет на реализацию бесконтактной иммуносупрессии.
5. МСК способны поддерживать выживание интактных Т-лимфоцитов в отсутствие стимуляции, сопровождающееся увеличением поверхностного уровня CD25 и ICAM-1 на CD4 Т-хелперах.

Во время воспаления стимулированные лимфоциты активно делятся и продуцируют большое количество провоспалительных цитокинов. Основное действие МСК на активированные лимфоциты проявляется в подавлении их функций, путем блокировки пролиферации или запуска апоптоза.

При изучении взаимодействия МСК и лимфоцитов *in vitro* нами было показано, что МСК осуществляют свою иммуносупрессорную активность уже через 48 часов, при этом эффект дозозависим (максимальный эффект обнаружен при соотношении между МСК и лимфоцитами, равном 1/25) и заключается в подавлении пролиферации активированных лимфоцитов (см с 74 Рис. 7А.). Также мы обратили внимание, что контактные взаимодействия между МСК и лимфоцитами вносят дополнительный вклад и блокируют пролиферацию активированных ЛПК эффективнее (на 40%, по сравнению с контролем), чем обмен растворимыми факторами в рамках бесконтактных механизмов (на 20%, по сравнению с контролем). Подобные эффекты наблюдали Di Nikola с коллегами, используя систему *in vitro*, в которой изучали влияние человеческих МСК костного мозга на смешанную культуру лимфоцитов (СКЛ) [64]. Исследователи показали, что бесконтактное действие МСК оказывает иммуносупрессорный эффект, однако контакты между МСК и СКЛ усиливают его действие [64]. В свою очередь, мы обнаружили, что в условиях иммуносупрессии эффект снижения пролиферации не связан со способностью МСК влиять на спонтанный апоптоз активированных CD4 Т-лимфоцитов (см с 77 Рис. 11.). Кроме этого, контактные взаимодействия между МСК и ЛПК не влияют на индукцию апоптоза в Т-клетках *in vitro*, как это было описано в некоторых работах [12, 16]. Однако, на мышинных МСК *in vivo* было показано, что они способны вызывать временный спонтанный апоптоз CD3 лимфоцитов в модели индуцированного экспериментального колита. При этом исследователи отметили снижение диареи и кровотечений у мышей с трансплантированными МСК, а также значительное снижение популяции Th17 у этих экспериментальных животных. Впоследствии подобные результаты попытались повторить для лечения пациентов с системным склерозом при введении аллогенных МСК. Последующий анализ также показал способность МСК индуцировать спонтанный апоптоз Т-клеток у таких пациентов [12]. Однако это единственное на сегодняшний момент исследование, подтверждающее способность МСК индуцировать спонтанный апоптоз у Т-клеток, и данный вопрос требует дальнейшего изучения.

В литературе широко описано подавление секреторной функции активированных лимфоцитов при блокировке их пролиферации под действием МСК, сопровождающееся снижением CD25 на поверхности Т-клеток [256], однако нет сведений, является ли снижение уровня CD25 на поверхности Т-клеток причиной или следствием блокировки пролиферации в рамках программы иммуносупрессии, реализуемой МСК. В ряде работ показано,

что добавление избытка IL-2 действительно приводит к частичному восстановлению пролиферации лимфоцитов, [305], наблюдения других исследователей, наоборот, утверждают, что в случае Т-клеточного ареста под действием МСК дополнительная стимуляция, либо IL-2, либо антигеном приводит только к восстановлению секреторной функции лимфоцитов и не влияет на их пролиферацию [96]. Наши же данные, полученные *in vitro*, достоверно подтверждают тот факт, что между снижением пролиферации и уменьшением уровня CD25 на поверхности Т-клеток существует тесная взаимосвязь (см с 75 Рис. 8. и с 78 Рис. 12Б.). Сравнение данных, полученных после инкубации лимфоцитов в составе ЛПК, либо в виде одиночной CD4 популяции Т-клеток с МСК показало, что уровень снижения CD25 на поверхности активированных Т-хелперов в описанных популяциях значительно не отличается, что позволяет нам говорить, об иммуносупрессорном действии МСК только на активированные Т-лимфоциты. Данное наблюдение хорошо согласуется с исследованиями других. Например, Tse и коллеги изучали иммуносупрессорные свойства МСК, оценивая степень пролиферации лимфоцитов в популяции ЛПК, в «очищенной» CD3 популяции и «очищенной» CD4 популяции [281]. Во всех случаях активацию лимфоцитов проводили, так же, как и в нашей работе, антителами к CD3 и CD28. Сравнение снижения скорости пролиферации лимфоцитов, которую исследователи оценивали по включению ³H-тимидиновой метки в делящиеся лимфоциты, во всех случаях показало схожие результаты – направленное подавление популяции активированных CD4 клеток [281]. Поскольку в экспериментах по иммуносупрессии мы изучали инкубацию МСК с популяцией лимфоцитов в составе ЛПК, логично предположить, что помимо CD4 Т-лимфоцитов активируются и CD8 Т-клетки. По нашим данным, во фракции ЛПК происходит активация CD8 Т-клеток на уровне, сравнимом с таковым у CD4 лимфоцитов. При этом МСК также снижают долю клеток, несущих на поверхности CD25, среди CD8 лимфоцитов. В процентном соотношении (доля несущих CD25 Т-лимфоцитов) по сравнению с контролем (активированные ЛПК, инкубируемые отдельно) МСК оказывают одинаковый по эффективности иммуносупрессорный эффект на оба вида Т-клеток (данные не представлены).

Таким образом, мы полагаем, что в условиях инкубации МСК и активированных лимфоцитов бесконтактные и контактные взаимодействия между двумя типами клеток приводят к запуску в МСК иммуносупрессорной программы, действие которой направлено адресно на активированные Т-клетки. В ходе выполнения этой молекулярной программы,

реализуемой МСК, на лимфоцитах снижается уровень молекул CD25. Результатом такого снижения является невозможность лимфоцитов эффективно связывать IL-2, необходимый им для выживания и поддержания пролиферации. Вследствие этого, по нашим предположениям, наступает блокировка пролиферативной активности лимфоцитов, однако при этом Т-клетки не погибают, а скорее впадают в состояние анергии, вызванной МСК (Рис. 33.) и описанной в литературе [96].

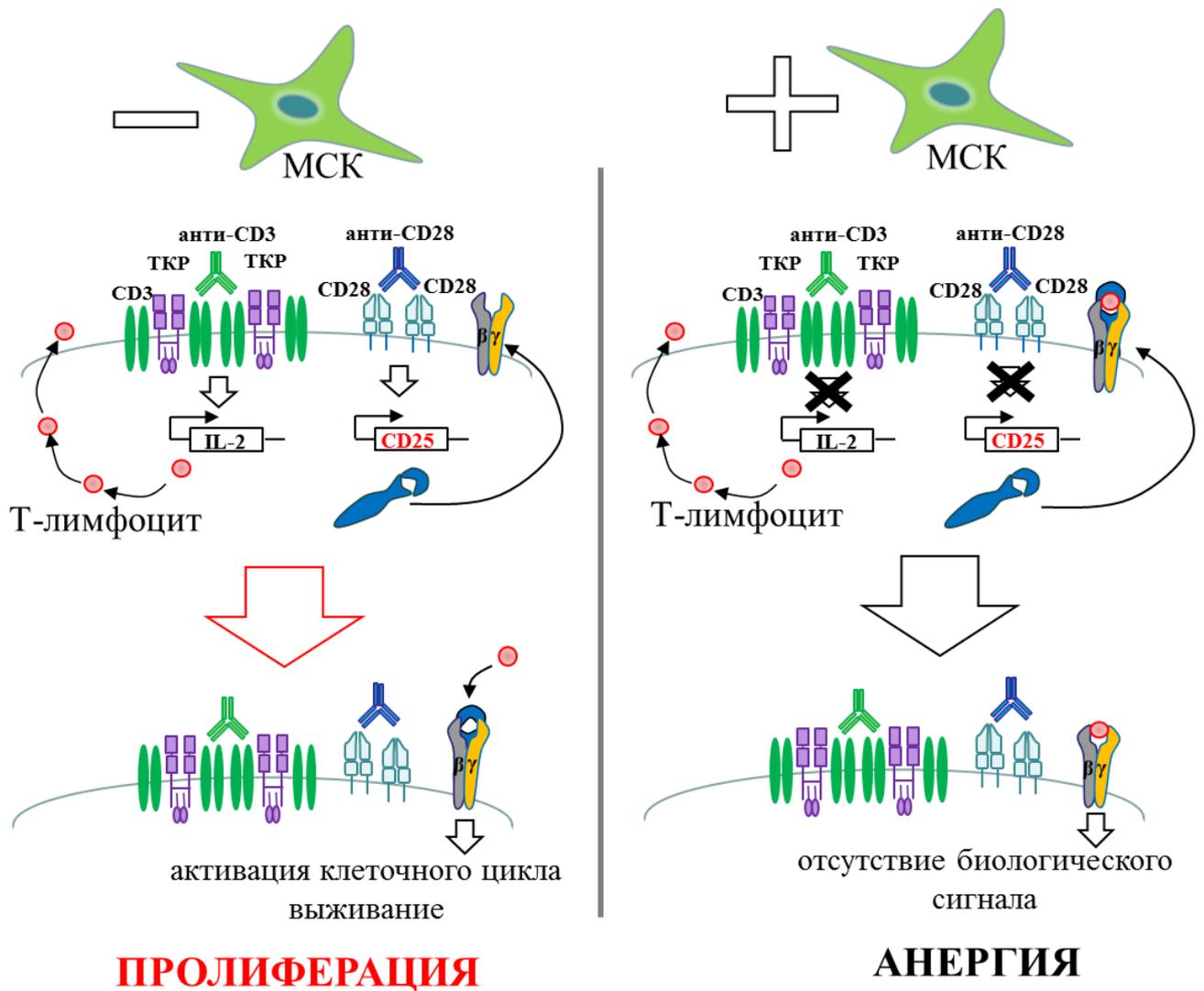


Рис. 33. Предполагаемая схема инициации в активированных лимфоцитах неканонического толерогенного фенотипа под действием МСК.

Использованы данные из [22, 232].

В литературе также открыт вопрос о приобретении МСК новых фенотипов после взаимодействия с определенным микроокружением. На МСК были обнаружены TLR4, узнающие липополисахариды грамотрицательных бактерий, и TLR3, узнающие двухцепочечные РНК некоторых вирусов. Полагают, что в зависимости от стимуляции того или иного

TLR МСК способны поляризоваться либо в воспалительные МСК1 (активация TLR4), либо противовоспалительные МСК2 (активация TLR3) фенотипы. При специфической активации TLR3 МСК человека секретируют IL-6, IL-8, увеличивают уровень мРНК IDO и уровень секреции PGE2. Однако если специфически активировать TLR-4, то МСК секретируют провоспалительные цитокины и хемоаттрактанты IL-4, IL-10, CCL10, CCL5 [297]. В данной работе наличие TLR3, TLR4 на поверхности МСК мы не изучали, однако показали, что взаимодействие с лимфоцитами не приводит к изменению поверхностного уровня основных фенотипических маркеров МСК: CD90, CD105, CD73, (см с 75 Рис. 9.). Это позволяет нам предположить, что в условиях иммуносупрессии МСК не претерпевают дальнейшую дифференцировку и сохраняют свою мезенхимную природу.

Известно, что МСК способны осуществлять иммуносупрессию за счет бесконтактных механизмов [20]. В литературе описан ряд факторов, среди которых IDO, iNOS, PGE2, TGF- β , IGFBR и другие, участвующие в контакт-независимой иммуносупрессии. Однако, несмотря на активное изучение бесконтактных механизмов иммуносупрессии, до сих пор нет четкого понимания, как организовано взаимодействие между растворимыми факторами, продуцируемыми МСК в рамках контакт-независимой иммуносупрессии. Считается, что в основе бесконтактного механизма лежит какой-то основной фактор, например, в случае человеческих МСК – это IDO [61]. Накопленные данные последних лет ставят под сомнение это предположение и показывают, что МСК, по всей видимости, не обладают каким-то одним алгоритмом для реализации контакт-независимой иммуносупрессии, а скорее комбинируют их в зависимости от условий микроокружения. В пользу этой гипотезы свидетельствуют расширение списка кандидатных эффекторных молекул, продуцируемых МСК в рамках программы бесконтактной иммуносупрессии [83]. В нашей работе добавление супернатантов, полученных после контактной и бесконтактной иммуносупрессии к активированным лимфоцитам, культивируемым без МСК, через 48 часов приводило к снижению уровня CD25 на поверхности CD4 Т-клеток (см с 79 Рис. 13.). При этом культивирование лимфоцитов в супернатанте от контактной иммуносупрессии приводило к максимальному снижению доли CD25⁺ Т-клеток среди CD4 Т-хелперов (40% по сравнению с контролем). Анализ экспрессионного профиля МСК при добавлении к ним супернатантов после контактной и бесконтактной иммуносупрессии выявил высокий уровень мРНК IDO (см с 80 Рис. 14.). Данное наблюдение согласуется с работой DelaRosa и коллег. Они показали, что индукция IDO находится под контролем IFN- γ и добавление

этого цитокина является необходимым условием для реализации иммуносупрессорной программы МСК с участием IDO [61]. В отличие от DelaRosa мы подтвердили увеличение синтеза IDO и на уровне белка, установив корреляцию между увеличением мРНК гена IDO и его продукта транскрипции, что было сделано впервые, несмотря на активное изучение этого механизма в других работах. При анализе уровня экспрессии гена IDO мы обнаружили увеличение количества мРНК IDO, как при инкубации МСК с активированными, так и интактными лимфоцитами (см с 81 Рис. 15А). Но в лизатах МСК после инкубации с интактными лимфоцитами значимого увеличения IDO на уровне белка нами зарегистрировано не было (см с 81 Рис. 15Б.). Мы предполагаем, что в случае активированных Т-клеток система контроля иммуносупрессорной программы МСК разрешает дальнейший синтез IDO для реализации программы иммуносупрессии, а в случае же не стимулированных Т-клеток система блокирует дальнейшее развитие программы иммуносупрессии, а синтезированные молекулы мРНК IDO могут не транслироваться, либо синтезируемый белок IDO сразу подвергается протеасомной деградации. В работе DelaRosa было установлено, что блокировка ферментативной активности IDO (продукция кинуренина) приводит к полному восстановлению пролиферации активированных антителами против CD3 и CD28 ЛПК [61]. Заингибирав продукцию кинуренина в рамках изучения иммуносупрессии, мы смогли добиться полного восстановления доли CD4CD25⁺ Т-лимфоцитов, по сравнению с контролем в условиях контакт-независимой иммуносупрессии (см с 82 Рис. 16А). Мы не обнаружили в рамках изучения бесконтактной программы иммуносупрессии в МСК повышенной экспрессии генов PTGS2 (основной в синтезе PGE₂), TGFB (данные не представлены), белковые продукты которых считаются важными индукторами Т-регуляторного FoxP3 фенотипа [74]. Однако, к нашему удивлению, мы детектировали в МСК значительное увеличение мРНК гена NOS2 при инкубации с активированными лимфоцитами (см с 84 Рис. 18.). Это было неожиданно, так как активность гена NOS2, в основном связана с иммуносупрессией мышинных МСК [226]. Возможным объяснением увеличения транскрипционной активности NOS2 в МСК человека может служить участие NO в регуляции ферментативной активности IDO. Было показано, что в малых концентрациях (10 мкМ) NO приводит к увеличению активности IDO в линии клеток моноцитов лимфомы U937, стимулированных IFN- γ , но большие концентрации NO снижают ферментативную активность IDO. Авторы полагают, что NO регулирует активность IDO за счет разной степени нитрозилирования тирозиновых остатков в структуре

IDO [162]. Нам не удалось детектировать увеличение белка iNOS методом иммуноблоттинга в лизатах МСК после совместной инкубации с активированными лимфоцитами (см с 85 Рис. 19В.) или же детектировать физиологически значимые содержания NO в супернатантах. (см с 85 Рис. 19Б.). Добавление специфического ингибитора iNOS, L-NMMA к контактными и бесконтактными смешанным культурам МСК и лимфоцитов не приводило к повышению доли CD4CD25⁺ Т-лимфоцитов при сравнении данных от совместной инкубации МСК и лимфоцитов в присутствии и в отсутствии L-NMMA (см с 85 Рис. 19А). Этот факт окончательно подтвердил отсутствие влияния iNOS на Т-клетки в рамках иммуносупрессорной программы МСК. Нам остается лишь предположить, что в условиях иммуносупрессии Т-клеток с помощью МСК человека количество синтезируемых молекул iNOS находится ниже пределов детекции методом вестернблоттинга. Поэтому не удивительно, что мы не зарегистрировали наличия NO в супернатантах от совместной инкубации МСК и лимфоцитов в условиях иммуносупрессии. Мы связываем полученные результаты с высокой степенью деградации или неэффективностью трансляции iNOS.

Таким образом, мы можем полагать, что основное действие контакт-независимой иммуносупрессии лимфоцитов с помощью МСК связано с увеличением уровня IDO и его дальнейшей ферментативной активности. Ферментативное действие IDO связано с превращением внеклеточного триптофана в кинуренин. Установлено токсическое действие кинуренина и его продуктов на Т-клетки, а также известно, что снижение внеклеточного пула триптофана за счет ферментативного действия IDO может приводить к блокировке пролиферации лимфоцитов [77, 78]. Поскольку влияния МСК на увеличение процента спонтанного апоптоза лимфоцитов нами обнаружено не было (см с 77 Рис. 11.), мы полагаем, что наблюдаемые нами эффекты: снижение доли Т-клеток, несущих на своей поверхности CD25 и снижение пролиферации активированных лимфоцитов в большей степени связаны не с цитотоксическим эффектом продуктов IDO, а с индукцией Т-клеточного ареста, описанного в литературе [78] (Рис. 34.).

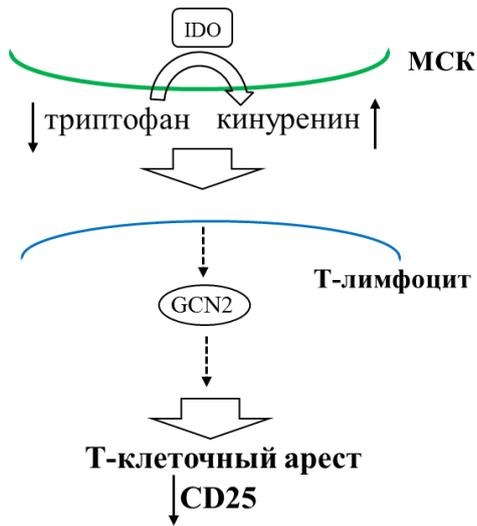


Рис. 34. Предполагаемая схема индукции Т-клеточного ареста, опосредуемого ферментативной активностью IDO в рамках иммуносупрессорной программы МСК. Использованы данные из [107, 181] GCN2 - киназа-сенсор свободных аминокислот.

В рамках изучения иммуносупрессии, результаты наших экспериментов по инкубации МСК и активированных лимфоцитов отчетливо продемонстрировали важную роль контактных взаимодействий в молекулярной программе иммунорегуляции МСК, так как наличие контактов между клетками значительно повышало эффективность иммуносупрессии (см с 74 Рис. 7А и с 78 Рис. 12.), что согласуется с данными других исследователей [138, 228]. Активное изучение подобных взаимодействий позволило выявить ряд кандидатных молекул, список которых постепенно пополняется. Среди них были обнаружены белки, участвующие в инициации апоптоза, такие как: Fas и FasL [12]. Также отмечено участие рецептора и лиганда PD-1/PD-L1 в блокировке пролиферации и секреции воспалительных цитокинов лимфоцитами [167], однако, установлено, что взаимодействие секреторной формы PD-L1, синтезируемой МСК небной впадины человека, при связывании с PD-1 на поверхности Th17 может инициировать апоптоз у лимфоцитов [131]. Помимо этого показано, что молекула B7-H4, синтезируемая МСК костного мозга, способна инициировать Т-клеточный арест путем блокировки перемещения транскрипционного фактора NF-κB в ядро [301]. В условиях иммуносупрессии в наших экспериментах МСК не вызывали спонтанный апоптоз Т-клеток что отвергает участие пары Fas/FasL в контакт-зависимой иммуносупрессии и согласуется с данными других работ [64]. Реализация механизмов иммуносупрессии с участием PD-1/PD-L1 в большинстве работ показана для Th17 лимфоцитов и, по-видимому, является специфичной непосредственно для этого типа Т-клеток [167]. В свою очередь на моделях *in vivo* было продемонстрировано, что МСК довольно часто мигрируют в лимфатические узлы, при системном введении в кровотоки животным [52, 305]. Кроме того, МСК несут набор молекул адгезии, схожий с таковым у эпителиальных клеток лимфоидных органов, что дает основания предполагать возможное участие молекул адгезии на поверхности МСК в регуляции иммунитета [20]. Известно, что МСК способны к экспрессии на своей поверхности CD40, CD164, L- и P-селектинов, PECAM, а также ICAM

и VCAM [60]. На данный момент было установлено, что в ходе иммуносупрессии мышечные МСК многократно увеличивают на своей поверхности уровень ICAM-1 и VCAM-1 под действием комбинации воспалительных цитокинов IFN- γ + TNF- α или IFN- γ + IL-1 α . При этом эффективность иммуносупрессии значительно снижалась у МСК, нокаутных по ICAM-1 как *in vitro*, так и *in vivo* [228]. Для человеческих МСК в одной из работ было показано увеличение VCAM независимо от наличия или отсутствия контактов. Как полагают исследователи, VCAM в паре с LFA-3 взаимодействуют со своими рецепторами на поверхности лимфоцитов (VLA-4 и CD2 соответственно) и, возможно, могут быть вовлечены в продукцию растворимых факторов иммуносупрессии, а именно IL-10 и TGF- β [196].

Нами установлено, что в условиях иммуносупрессии в МСК многократно возрастает уровень мРНК ICAM1 (см с 87 Рис. 20А.), но при этом статистически значимых изменений в уровне мРНК VCAM1 и детекции этой молекулы на поверхности МСК нами зарегистрировано не было (см с 88 Рис. 22.), в отличие от данных Rep и коллег [228], что может в очередной раз свидетельствовать о существовании отличий в осуществлении контакт-зависимой иммуносупрессии на молекулярном уровне среди МСК из разных организмов.

Оценка уровня ICAM-1 на поверхности МСК при инкубации с активированными лимфоцитами показала, что количество этой молекулы увеличивается как в контактных, так и бесконтактных условиях культивирования – это указывает на участие растворимых факторов в индукции ICAM-1. Мы показали, что супернатанты после контактной и бесконтактной иммуносупрессии вызывают значительное увеличение уровня мРНК ICAM1 в МСК и не стимулированных лимфоцитах, культивируемых отдельно. При этом установлено, что инкубация лимфоцитов и МСК в супернатанте после контактной иммуносупрессии вызовет максимальную активацию гена ICAM1 в обоих типах клеток (см с 91 Рис. 26.). В работах по индукции ICAM-1 и VCAM-1 на мышечных МСК использовали комбинацию IFN- γ с TNF- α . Изучение нами цитокинового профиля супернатанта от совместной инкубации МСК и активированных лимфоцитов не обнаружило многократного увеличения уровня IFN- γ и TNF- α при совместной инкубации, по сравнению с контролем (данные не представлены), что позволяет нам говорить о возможном наличии других растворимых факторов для индукции ICAM-1 на поверхности человеческих МСК. Стоит от-

метить, что в ряде работ по изучению фенотипического профиля МСК упоминалась регистрация молекулы ICAM-1 на поверхности клеток, однако в этих работах исследователи никак не описывают условия, при которых наличие этой молекулы на поверхности МСК было обнаружено [60, 208]. Мы же в ходе экспериментов постоянно проводили детекцию ICAM-1 на поверхности МСК 4 пассажа, культивируемых отдельно от лимфоцитов. Ни разу нами не было зарегистрировано наличие ICAM-1 на поверхности МСК, культивируемых отдельно. Однако, мы неоднократно регистрировали высокий уровень ICAM-1 на поверхности МСК при инкубации с лимфоцитами, интактными или стимулированными (см с 87 Рис. 20Б-В.). Таким образом, мы полагаем, что появление молекул ICAM-1 на поверхности МСК является специфическим ответом на появление лимфоцитов. А данные других исследователей можно объяснить оценкой фенотипа свежeweыделенных МСК из костного мозга или же жировой ткани, которые находились до недавнего времени во взаимодействии с гематopoэтическими клетками, в том числе и лимфоцитами.

Увеличение количества молекулы ICAM-1 на эндотелии характерно в процессе роллинга лимфоцитов во время их взаимодействия с клетками эндотелия или при презентации антигена [30, 292]. Мы предположили возможное участие ICAM-1 в иммуносупрессорной программе. Мы установили, что при совместной инкубации с МСК контактным и бесконтактным способом в лимфоцитах увеличивается уровень мРНК ICAM1 (см с 89 Рис. 23А.), однако при этом МСК значительно (на $33 \pm 7,2\%$ в контактных условиях) снижают долю стимулированных CD4 Т клеток, несущих ICAM-1 на своей поверхности. Помимо этого, при инкубации активированных лимфоцитов с МСК снижается общее количество CD4ICAM-1⁺ Т-клеток (см с 89 Рис. 23Б.). Максимальный эффект снижения числа лимфоцитов был обнаружен при контактной инкубации (см с 89 Рис. 23Б.). Мы обнаружили, что добавление блокирующих ICAM-1 антител приводит к значительному восстановлению доли CD4CD25⁺ Т-клеток ($68,3 \pm 5,2\%$ контактная инкубация $89 \pm 2,4\%$ контактная инкубация с блокирующими антителами против ICAM-1) в культуре с МСК по сравнению с контролем (см с 92 Рис. 27А.). Полученные данные подтверждают важность молекул ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов для контакт-зависимой иммуносупрессии. Наши предварительные эксперименты по оценке профиля экспрессии молекул адгезии в МСК и лимфоцитах при совместной инкубации позволили исключить из списка кандидатов взаимодействия между VCAM-1 на МСК костного мозга человека и $\alpha 4$ -инте-

грином на CD4 T-клетках, обнаруженные другими авторами [173] из-за отсутствия статистически достоверных данных по изменению уровня мРНК и поверхностного уровня VCAM-1 в МСК (см с 88 Рис. 22.). Также в литературе широко описано взаимодействие LFA-1 на поверхности лимфоцитов с ICAM-1 эндотелия и других клеток. Однако данный комплекс в основном связан с миграцией лимфоцитов [258], а недавние работы продемонстрировали его участие в дифференцировке T-клеток, их активации и продукции IFN- γ [288], что противоречит наблюдаемым нами эффектам иммуносупрессии МСК по отношению к T-клеткам. Поэтому данный механизм мы также исключили из рассмотрения.

Наши данные показали, что в условиях контактной иммуносупрессии в присутствии блокирующих антител на ICAM-1 доля CD4CD25⁺ T-клеток была ниже по сравнению с контролем. Мы считаем, что данный эффект может быть связан с продолжительным действием механизмов контакт-независимой иммуносупрессии (см с 92 Рис. 27А.). Мы предположили, что, возможно, существует влияние контактных механизмов иммуносупрессии, связанных с ICAM-1, на синтез и секрецию IDO в МСК. Однако, блокировка ICAM-1 на поверхности МСК не приводила к изменениям IDO на уровне белка (см с 95 Рис. 29В.). Также не было обнаружено снижения уровня кинуренина в полученных супернатантах от контактной иммуносупрессии с блокировкой ICAM-1, по сравнению с данными от контактной иммуносупрессии без блокировки антителами против ICAM-1 (см с 95 Рис. 29А.). Эти результаты согласуются с данными Rep и коллег, которые продемонстрировали, что нокаут ICAM1 в мышинных МСК снижал иммуносупрессорный эффект МСК на активированные T-клетки. Отсутствие ICAM-1 также не влияло на уровень NO, продуцируемый МСК [228]. Помимо этого, важность ICAM-1 для иммуносупрессорных программ МСК недавно была продемонстрирована на модели *in vivo*. Исследователи вводили мышам с искусственно вызванной GvHD модифицированные мышинные МСК, способные к повышенной продукции ICAM-1. После введения МСК на 7 сутки было обнаружено значительное снижение развития синдрома. Анализ распределения меченых МСК показал их наибольшее скопление во вторичных лимфоидных органах. Причем модифицированные МСК мигрировали в лимфатические узлы гораздо эффективнее, чем МСК дикого типа. Анализ лимфоцитов из таких узлов продемонстрировал процентное снижение популяции Th1 и снижение уровня мРНК IFN- γ и TNF- α в лимфоцитах. Помимо этого, было обнаружено увеличение процентного содержания Treg. В обоих случаях отмечено, что наиболь-

шим иммунорегулирующим эффектом на Th1 и Treg обладали именно модифицированные МСК. Несмотря на то, что подробный молекулярный механизм участия ICAM-1 в супрессии лимфоцитов не изучался, не остается сомнений, что увеличение количества молекул ICAM-1 на поверхности МСК способствовало более эффективному взаимодействию с лимфоцитами [269].

Данные литературы последних лет указывают на то, что помимо иммуносупрессорного действия МСК обладают еще и иммуностимулирующей программой [23]. Мы обнаружили, что в системе *in vitro* при совместной инкубации МСК с тотальной популяцией ЛПК, активированных ФГА, поддержка выживания лимфоцитов может происходить при соотношении клеток МСК к ЛПК 1/10. Поддержка пролиферации лимфоцитов наблюдалась уже через 2 дня совместной инкубации (см с 96 Рис. 30.). Частично наши наблюдения согласуются с литературными данными [112] и могут быть объяснены недостаточным количеством воспалительных факторов, генерируемых лимфоцитами и моноцитами, что приводит к переключению МСК в фенотип, поддерживающий выживание лимфоцитов [150]. Мы наблюдали эффект поддержки выживания лимфоцитов со стороны МСК как в контактных условиях, так и бесконтактных условиях инкубации. Это свидетельствует об участии растворимых факторов в данном процессе. В литературе описана возможная роль IL-6, секретируемого МСК и поддерживающего пролиферацию Т-клеток в условиях недостаточной активации. [150]. Более того, было продемонстрировано его участие в поддержании активности Th17 со стороны МСК [103]. Однако анализ супернатантов от инкубации МСК с активированными или интактными лимфоцитами в нашей работе никаких статистически значимых изменений в уровне IL-6 по сравнению с контролями (среда от МСК и лимфоцитов, инкубируемых отдельно) не выявил (данные не представлены), что позволяет предположить наличие других важных факторов. Например, было показано, что лиганды для рецепторов Т-клеток CCR5 и CXCR3, продуцируемые МСК, играют важную роль в поддержке пролиферации лимфоцитов со стороны МСК [150].

Согласно нашим наблюдениям, инкубация очищенной популяции интактных Т-хелперов с МСК контактным и бесконтактным способом благоприятствует выживанию лимфоцитов, что выражается в увеличении их числа, а также небольшом, но статистически значимом увеличении уровня CD25 (см с 97 Рис. 31.). Мы предполагаем, что, возможно, в поддержке выживания лимфоцитов может участвовать молекула адгезии ICAM-1, так как инкубация МСК с не стимулированными лимфоцитами в составе ЛПК приводит к

увеличению доли и числа $CD4ICAM-1^+$ Т клеток (см с 89 Рис. 23В.). Более того блокировка ICAM-1 на поверхности МСК при контактной инкубации с не стимулированными Т-хелперами предотвращала поддержку выживания лимфоцитов со стороны МСК, так как доля несущих $CD4CD25^+$ лимфоцитов не отличалась от контроля – интактных лимфоцитов, инкубированных отдельно (см с 98 Рис. 32.).

Таким образом, мы предполагаем, что ICAM-1, возможно, является молекулой, участвующей в интерпретации сигналов активации или, наоборот, толеризации лимфоцитов в иммунорегуляторной программе МСК (Рис. 35.).

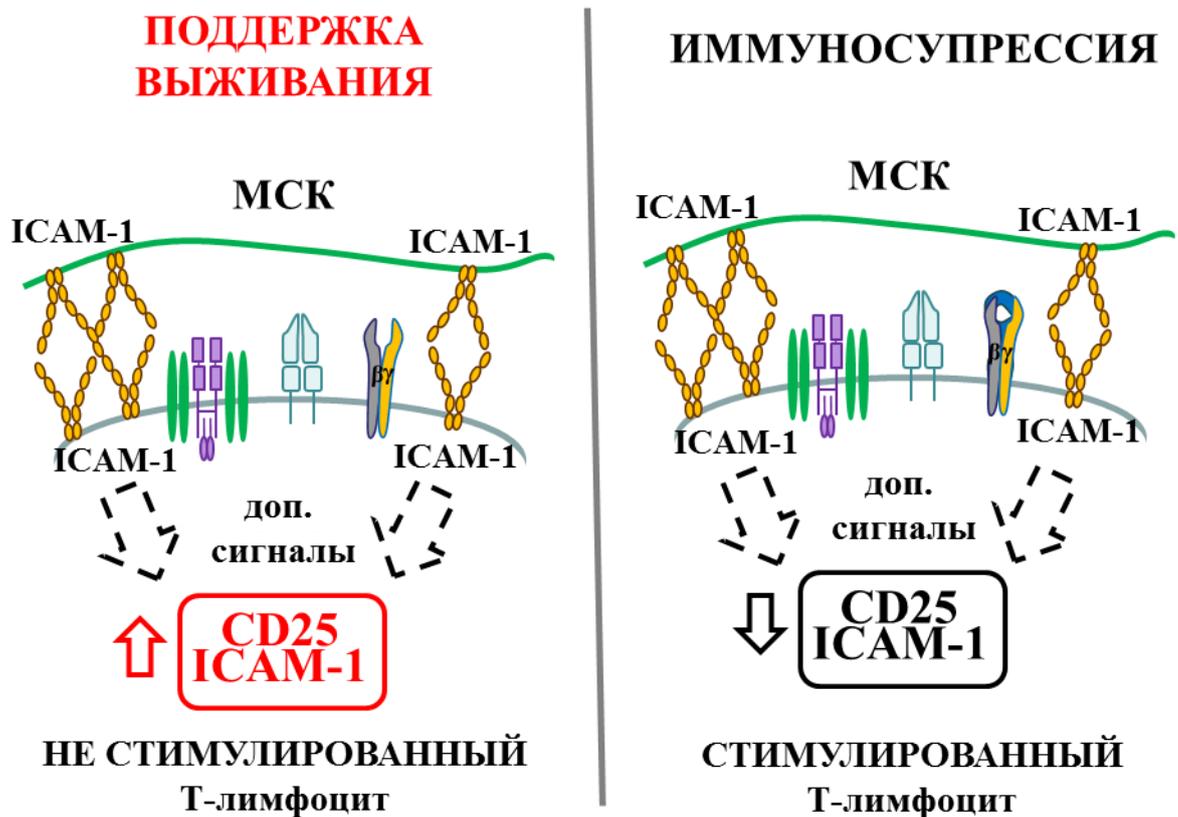


Рис. 35. Предполагаемая роль ICAM-1 в иммунорегуляторной программе МСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена взаимодействию МСК и Т-лимфоцитов человека. Мы показали, что реализуемая МСК иммунорегуляторная программа гибкая и, в зависимости от микроокружения, способна ингибировать активацию или, наоборот, поддерживать выживание Т-клеток (см с 78 Рис. 12, с 97 Рис. 31.). При этом молекула межклеточной адгезии ICAM-1 возможно играет функцию переключателя между иммуносупрессией и стимуляцией интактных Т-клеток (см с 92 Рис. 27, с 98 Рис. 32.). Мы полагаем, что наши наблюдения помогут в расшифровке механизмов действия МСК в ряде патологий, таких как ревматоидный артрит, реакция трансплантата против хозяина и некоторых других. На Рис. 36 представлено графическое заключение нашей работы.

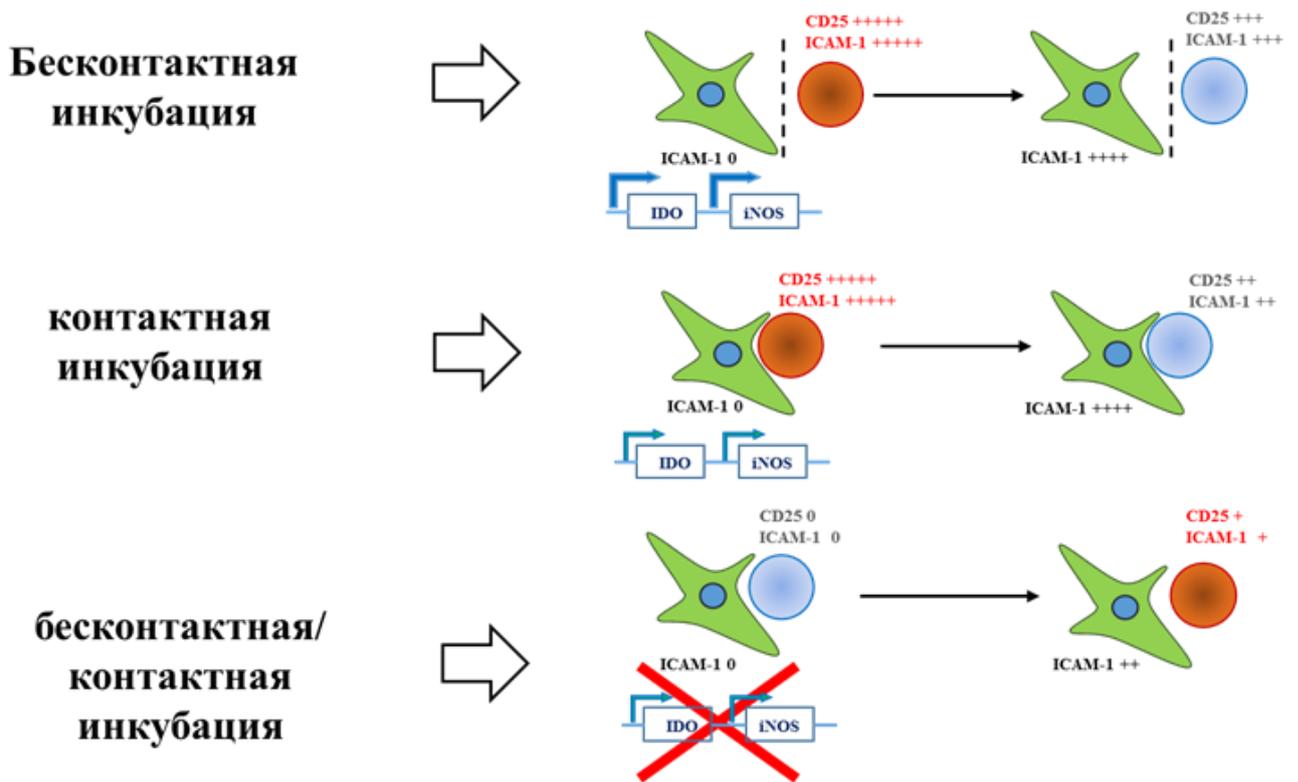


Рис. 36. Обнаруженные молекулярные регуляторные механизмы МСК на Т-лимфоциты человека. +++++ - уровень синтеза до начала совместной инкубации МСК и лимфоцитов, +++ уровень синтеза после бесконтактной инкубации МСК и лимфоцитов, ++ уровень синтеза после контактной инкубации МСК и лимфоцитов, уровень синтеза в условиях поддержания выживания лимфоцитов МСК, 0 – отсутствие синтеза.

ВЫВОДЫ

1. Инкубация мезенхимных стромальных клеток и стимулированных антителами к CD3 и CD28 лимфоцитов приводит к замедлению скорости пролиферации Т-клеток, сопровождающейся снижением пропорции и числа CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. При этом максимальный эффект негативного влияния мезенхимных стромальных клеток на лимфоциты достигается при установлении контактов между двумя типами клеток.
2. При проявлении иммуномодулирующей активности на Т-лимфоциты в мезенхимных стромальных клетках не происходит изменений поверхностного фенотипа по уровню маркеров CD90 (заякоренный белок с варибельным иммуноглобулиноподобным доменом), CD105 (эндоглин), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), детектируемых методом проточной цитометрии при помощи окраски конъюгированными с флуорофорами антителами.
3. Бесконтактная и контактная инкубация с Т-клетками приводит к увеличению транскрипции, уровня белка и ферментативной активности индоламин-2,3-диоксигеназы IDO в мезенхимных стромальных клетках, что было продемонстрировано методами ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинга и иммуноферментного анализа, оценивающего уровень кинуренина в супернатантах от совместной инкубации мезенхимных стромальных клеток и лимфоцитов.
4. Блокировка межклеточной молекулы адгезии ICAM-1 на поверхности мезенхимных стромальных клеток и стимулированных антителами к CD3 и CD28 очищенных CD4 Т-хелперов приводит к увеличению пропорции и числа CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, что может свидетельствовать о снижении иммуносупрессорного влияния мезенхимных стромальных клеток на лимфоциты. Блокировка ICAM-1 на поверхности мезенхимных стромальных клеток и стимулированных CD4 Т-хелперов не приводит к изменениям IDO на уровне мРНК и белка, что характеризует независимое действие контактной и бесконтактной иммуносупрессии мезенхимных стромальных клеток на лимфоциты.
5. Совместная инкубация мезенхимных стромальных клеток и интактных CD4 Т-хелперов приводит к увеличению доли и числа CD4⁺CD25⁺ICAM-1⁺ Т-клеток, что

свидетельствует о способности МСК поддерживать выживание интактных лимфоцитов. Блокировка ICAM-1 на поверхности клеток отменяет эффект поддержки лимфоцитов со стороны мезенхимных стромальных клеток

- б. При совместной инкубации с лимфоцитами мезенхимные стромальные клетки оказывают иммуносупрессорное влияние только на стимулированные антителами к CD3 и CD28 Т-лимфоциты, которое проявляется в снижении скорости пролиферации Т-клеток и уменьшении доли и числа CD4⁺CD25⁺ICAM-1⁺ лимфоцитов. В условиях отсутствия стимуляции Т-клеток мезенхимные стромальные клетки способны поддерживать выживание интактных Т-клеток, увеличивая число и долю CD4⁺CD25⁺ICAM-1⁺ лимфоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Размеры внеклеточных везикул, секретируемых разными видами стволовых клеток / Алчинова И.Б. [и др.] // Патогенез. - 2017. - Т. 15. - С. 38–42.
2. Направленная миграция и мезенхимальные прогениторные клетки: участие в воспалении, репарации и регенерации ткани / Воротников А.В. [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина п/ред. Проф. В.А Ткачука. - Москва, 2012. - С. 57–91.
3. Долговременные эффекты стволовых клеток на облученных мышей / Вялкина М.В. [и др.] // Биомедицина. - 2017. - № 4. - С. 18–33.
4. Влияние провоспалительного цитокина TNF-Alpha на способность мезенхимальных клеток к хоумингу в поврежденную ткань / Зубкова Е.С. [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина п/ред. Проф. В.А Ткачука. - Москва, 2012. - С. 169–183.
5. Сокультивирование с мезенхимальными стромальными клетками пупочного канатик человека поддерживает жизнеспособность кроветворных стволовых клеток пуповинной крови, но не "стволовость" их потомков / Романов Ю.А. [и др.] // Клеточные Технологии В Биологии И Медицине. 2017. № 2. С. 71–76.
6. Сравнительный анализ секретома мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика и костного мозга человека / Романов Ю.А. [и др.] // Клеточные Технологии В Биологии И Медицине. - 2018. - № 4. - С. 220–225.
7. Сравнительное исследование влияния мезенхимальных стволовых клеток на приживаемость жировых аутотрансплантатов путем гистологической оценки в эксперименте на мелких лабораторных животных / Старцева О.И. [и др.] // Анналы Пластической, Реконструктивной И Эстетической Хирургии. - 2018. - № 4. - С. 12–17.
8. Комбинация мезенхимных стромальных клеток и стволовых клеток сердца в составе многослойной клеточной конструкции способствует активации сигнального пути Notch и инициации эндотелиальной дифференцировки / Шевченко Е.К. [и др.] // Клеточные Технологии В Биологии И Медицине. - 2018. - № 4. - С. 233–238.
9. Transmembrane signaling during interleukin 1-dependent T cell activation. Interactions of signal 1- and signal 2-type mediators with the phosphoinositide-dependent signal transduction mechanism / Abraham R.T. [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. - 1987. - Vol. 262. - № 6. - P. 2719–2728.
10. Aggarwal S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / Aggarwal S., Pittenger M.F. // Blood. - 2005. - Vol. 105. - № 4. - P. 1815–1822.
11. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice / Ait-Oufella H. [et al.] // Nature Medicine. - 2006. - Vol. 12. - № 2. - P. 178–180.
12. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand/FAS-mediated T cell apoptosis / Akiyama K. [et al.] // Cell Stem Cell. - 2012. - Vol. 10. - № 5. - P. 544–555.
13. Andersen M.H. The specific targeting of immune regulation: T-cell responses against Indoleamine 2, 3-dioxygenase / Andersen M.H. // Cancer immunology, immunotherapy: CII. - 2012. - Vol. 61. - № 8. - P. 1289–1297.
14. Interaction of multipotent mesenchymal stromal and immune cells: Bidirectional effects / Andreeva E. [et al.] // Cytotherapy. - 2017. - Vol. 19 - № 10. - P. 1152–1166.
15. Asari S. [и др.]. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation // Experimental Hematology. 2009. № 5 (37). С. 604–615.

16. Augello A. [и др.]. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis // *Arthritis and Rheumatism*. 2007. № 4 (56). С. 1175–1186.
17. Bai L. [и др.]. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis // *Glia*. 2009. № 11 (57). С. 1192–1203.
18. Ball H.J. [и др.]. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009. № 3 (41). С. 467–471.
19. Barnes P.J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *The Journal of Clinical Investigation*. 2008. № 11 (118). С. 3546–3556.
20. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo / Bartholomew A. [et al.] // *Experimental Hematology*. - 2002. - Vol. 30. - № 1. - P. 42–48.
21. Differential regulation of IFN-gamma, IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway / Benbernou N. [et al.] // *Immunology*. - 1997. - Vol. 91. - № 3. - P. 361–368.
22. Benczik M. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes / Benczik M., Gaffen S.L. // *Immunological Investigations*. - 2004. - Vol. 33. - № 2. - P. 109–142.
23. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state / Benvenuto F. [et al.] // *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. - 2007. - Vol. 25. - № 7. - P. 1753–1760.
24. Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release / Berendji D. [et al.] // *FEBS letters*. - 1997. - Vol. 405. - № 1. - P. 37–41.
25. Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes / Berendji D. [et al.] // *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*. - 1999. - Vol. 5. - № 11. - P. 721–730.
26. Bernardo M.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation / Bernardo M.E., Fibbe W.E. // *Cell Stem Cell*. - 2013. - Vol. 13. - № 4. - P. 392–402.
27. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway / Bingisser R.M. [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. - 1998. - Vol. 160. - № 12. - P. 5729–5734.
28. Bobryshev Y.V. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance / Bobryshev Y.V. // *European Heart Journal*. - 2005. - Vol. 26. - № 17. - P. 1700–1704.
29. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle / Bosch P. [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. - 2000. - Vol. 18. - № 6. - P. 933–944.
30. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms / Boyd A.W. [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1988. - Vol. 85. - № 9. - P. 3095–3099.
31. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge / Brandau S. [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. - 2010. - Vol. 88. - № 5. - P. 1005–1015.

32. Brumatti G. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells / Brumatti G., Sheridan C., Martin S.J. // *Methods* (San Diego, Calif.). - 2008. - Vol. 44. - № 3. - P. 235–240.
33. Brüne B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? / Brüne B. // *Cell Death and Differentiation*. - 2003. - Vol. 10. - № 8. - P. 864–869.
34. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury / Bruno S. [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2009. № 5 (20). P. 1053–1067.
35. Bruno S. Role of mesenchymal stem cell-derived microvesicles in tissue repair / Bruno S., Camussi G. // *Pediatric Nephrology* (Berlin, Germany). -2013. - Vol. 28. - № 12. - P. 2249–2254.
36. Bruno S. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation / Bruno S., Deregibus M.C., Camussi G. // *Immunology Letters*. - 2015. - Vol. 168. - № 2. - P. 154–158..
37. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow / Campagnoli C. [et al.] // *Blood*. 2001. - Vol. 98. - № 8. - P. 2396–2402.
38. Complete reaction mechanism of indoleamine 2,3-dioxygenase as revealed by QM/MM simulations / Capece L. [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry. B*. - 2012. - Vol. 116. - № 4. - P. 1401–1413.
39. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells as trophic mediators / Caplan A.I., Dennis J.E. // *Journal of Cellular Biochemistry*. - 2006. - Vol. 98. - № 5. - P. 1076–1084.
40. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule / Carosella E.D. [et al.] // *Blood*. - 2008. - Vol. 111. - P. 4862–4870.
41. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells / Casiraghi F. [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 2008. - Vol. 181. - № 6. - P. 3933–3946.
42. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal / Ceuppens J.L. [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 1988. - Vol. 141. - № 11. - P. 3868–3874.
43. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells / Chabannes D. [et al.] // *Blood*. - 2007. - Vol. 110. - № 10. - P. 3691–3694.
44. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma / Chan J.L. [et al.] // *Blood*. - 2006. - Vol. 107. - № 12. - P. 4817–4824.
45. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via CD5(+) B regulatory cells / Chao K. [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. - 2016. - Vol. 7. - № 1. - P. 109.
46. ICAM-1 co-stimulation has differential effects on the activation of CD4+ and CD8+ T cells / Chen T. [et al.] // *European Journal of Immunology*. - 1999. - Vol. 29. - № 3. - P. 809–814.
47. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune hepatitis by activation of the programmed death 1 pathway / Chen Y. [et al.] // *Immunology Letters*. - 2014. Vol. 162. - № 2 Pt B. - P. 222–228.
48. Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cells on T Lymphocyte and Cytokine Expression in Nasal Polyps / Cho K.-S. [et al.] // *Otolaryngology-Head and Neck Surgery: Official*

- Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. - 2014. - Vol. 150. - № 6. - P. 1062–1070.
49. The role of dendritic cells in the innate immune system / Clark G.J. [et al.] // *Microbes and Infection*. - 2000. - Vol. 2. - № 3. - P. 257–272.
50. Compston A. Multiple sclerosis / Compston A., Coles A. // *Lancet* (London, England). - 2008. - Vol. 372. - № 9648. - P. 1502–1517.
51. Conget P.A. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells / Conget P.A., Minguell J.J // *Journal of Cellular Physiology*. - 1999. - Vol. 181. - № 1. - P. 67–73.
52. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis / Constantin G. [et al.] // *Stem Cells* (Dayton, Ohio). - 2009. - Vol. 27. - № 10. - P. 2624–2635.
53. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions / Corcione A. [et al.] // *Blood*. - 2006. - Vol. 107. - № 1. - P. 367–372.
54. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPTTM) and standard density gradient / Corkum C.P. [et al.] // *BMC immunology*. - 2015. - Vol. 16. - P. 48.
55. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity / Corry D.B. [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. - 1996. - Vol. 183. - № 1. - P. 109–117.
56. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs / Crisan M. [et al.] // *Cell Stem Cell*. - 2008. - Vol. 3. - P. 301–313.
57. Dalal J. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease / Dalal J., Gandy K., Domen J // *Pediatric Research*. - 2012. - Vol. 71. - № 4 Pt 2. - P. 445–451.
58. Role of ICAM-1 in antigen presentation demonstrated by ICAM-1 defective mutants / Dang L.H. [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 1990. - Vol. 144. - № 11. - P. 4082–4091.
59. Davidson A. Autoimmune diseases / Davidson A., Diamond B // *The New England Journal of Medicine*. - 2001. - Vol. 345. - № 5. - P. 340–350.
60. Deans R.J. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses / Deans R.J., Moseley A.B. // *Experimental Hematology*. - 2000. - Vol. 28. - № 8. - P. 875–884.
61. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells / DelaRosa O. [et al.] // *Tissue Engineering. Part A*. - 2009. - Vol. 15. - № 10. - P. 2795–2806.
62. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct dendritic cells to acquire tolerogenic phenotypes through the IL-6-mediated upregulation of SOCS1 / Deng Y. [et al.] // *Stem Cells and Development*. - 2014. - Vol. 23. - № 17. - P. 2080–2092.
63. C-Kit Cardiac Progenitor Cell Based Cell Sheet Improves Vascularization and Attenuates Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction in Rats / Dergilev K. [et al.] // *BioMed Research International*. - 2018. - Vol. 2018. - <https://doi.org/10.1155/2018/3536854>.
64. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli / Di Nicola M. [et al.] // *Blood*. - 2002. - Vol. 99. - № 10. - P. 3838–3843.

65. Ding G. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transform-ing growth factor- β 1 / Ding G., Niu J., Liu Y. // *Human Cell*. - 2015. - Vol. 28. - № 2. - P. 81–90.
66. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals / Djouad F. [et al.] // *Blood*. - 2003. - Vol. 102. - № 10. - P. 3837–3844.
67. Docheva D. Mesenchymal stem cells and their cell surface receptors. / Docheva D., Haasters F., Schieker M // *Current Rheumatology Reviews*. - 2008. - Vol. 4. - № 3. - P. 155–160.
68. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells / Đokić J. [et al.] // *European Journal of Immunology*. - 2013. - Vol. 43. - № 7. - P. 1862–1872.
69. Cross-Talk Between Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Dendritic Cells / Đokić J.M., Tomić S.Z., Čolić M.J. // *Current Stem Cell Research & Therapy*. - 2016. - Vol. 11. - № 1. - P. 51–65.
70. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / Dominici M. [et al.] // *Cytotherapy*. - 2006. - Vol. 8. - № 4. - P. 315–317.
71. Human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells / Du T. [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. - 2013. - Vol. 4. - № 3. - P. 59.
72. Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation / Dubois B. [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. - 1999. - Vol. 66. - № 2. - P. 224–230.
73. Eggenhofer E. Mesenchymal stem cell-educated macrophages / Eggenhofer E., Hoogduijn M.J // *Transplantation Research*. - 2012. - Vol. 1. - № 1. - P. 12.
74. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells / English K. [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. - 2009. - Vol. 156. - № 1. - P. 149–160.
75. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation / English K // *Immunology and Cell Biology*. - 2013. - Vol. 91. - № 1. - P. 19–26.
76. Esch T. Proinflammation: a common denominator or initiator of different pathophysiological disease processes / Esch T., Stefano G. // *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. - 2002. - Vol. 8. - № 5. - P. HY1-9.
77. T cell apoptosis by tryptophan catabolism / Fallarino F. [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. - 2002. - Vol. 9. - № 10. - P. 1069–1077.
78. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells / Fallarino F. [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. - 2006. - Vol. 176. - № 11. - P. 6752–6761.
79. CD105 promotes chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells through Smad2 signaling / Fan W. [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2016. - Vol. 474. - № 2. - P. 338–344.
80. Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes / Favaro E. [et al.] // *Diabetologia*. - 2014. - Vol. 57. - № 8. - P. 1664–1673.
81. Feghali C. Cytokines in acute and chronic inflammation / Feghali C.A., Wright T.M. // *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. - 1997. Vol. 2. - P. d12-26.

82. Fields P.E. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation / Fields P.E., Kim S.T., Flavell R.A. // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 2002. - Vol. 169. - № 2. - P. 647–650.
83. Unraveling the Mesenchymal Stromal Cells' Paracrine Immunomodulatory Effects / Fontaine M.J. [et al.] // *Transfusion Medicine Reviews*. - 2016. - Vol. 30. - № 1. - P. 37–43.
84. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines / Fossiez F. [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. - 1996. - Vol. 183. - № 6. - P. 2593–2603.
85. Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site / Foti M. [et al.] // *International Immunology*. - 1999. - Vol. 11. - № 6. - P. 979–986.
86. Fox D.A. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives / Fox D.A. // *Arthritis and Rheumatism*. - 1997. - Vol. 40. - № 4. - P. 598–609.
87. Friedenstein A.J. Osteogenic stem cell in bone marrow / Friedenstein A.J. // *Journal of Bone and Mineral Research*. - 1990. - Vol. 7. - P. 243–272.
88. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease / Fujino S. [et al.] // *Gut*. - 2003. - Vol. 52. - № 1. - P. 65–70.
89. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5 / Fuss L.J. [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 1996. - Vol. 157. - № 3. - P. 1261–1270.
90. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects / Gao F. [et al.] // *Cell Death & Disease*. - 2016. - Vol. 7. - P. e2062.
91. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis / Gerdoni E. [et al.] // *Annals of Neurology*. - 2007. - Vol. 61. - № 3. - P. 219–227.
92. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions / Gerosa F. [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 2005. - Vol. 174. - № 2. - P. 727–734.
93. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype / Ghannam S. [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 2010. - Vol. 185. - № 1. - P. 302–312.
94. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN-gammaR1 signaling and IDO expression / Gieseke F. [et al.] // *Blood*. - 2007. - Vol. 110. - № 6. - P. 2197–2200.
95. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells / Gieseke F. [et al.] // *Blood*. - 2010. - Vol. 116. - № 19. - P. 3770–3779.
96. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells / Glennie S. [et al.] // *Blood*. - 2005. - Vol. 105. - № 7. - P. 2821–2827.
97. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells / González M.A. [et al.] // *Arthritis and Rheumatism*. - 2009. - Vol. 60. - № 4. - P. 1006–1019.
98. Gordon M.Y. Extracellular matrix of the marrow microenvironment / Gordon M.Y. // *British Journal of Haematology*. - 1988. - Vol. 70. - № 1. - P. 1–4.

99. Gordon S. Alternative activation of macrophages / Gordon S. // *Nature Reviews. Immunology*. - 2003. - Vol. 3. - № 1. - P. 23–35.
100. Gordon S. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes / Gordon S., Mantovani A. // *European Journal of Immunology*. - 2011. - Vol. 41. - № 9. - P. 2470–2472.
101. Greenwood J. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. off / Greenwood J., Wang Y., Calder V.L. // *Immunology*. - 1995. - Vol. 86. - № 3. - P. 408–415.
102. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells / Groh M.E. [et al.] // *Experimental Hematology*. - 2005. - Vol. 33. - № 8. - P. 928–934.
103. Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells / Guo Z. [et al.] // *European Journal of Immunology*. - 2009. - Vol. 39. - № 10. - P. 2840–2849.
104. Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine *Escherichia coli* pneumonia / Gupta N. [et al.] // *Thorax*. - 2012. - Vol. 67. - № 6. - P. 533–539.
105. Haddad R. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? / Haddad R., Saldanha-Araujo F // *BioMed Research International*. - 2014. - Vol. 2014. - P. 216806.
106. Mesenchymal stromal cells improve survival during sepsis in the absence of heme oxygenase-1: the importance of neutrophils / Hall S. R. [et al.] // *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. - 2013. - Vol. 31. - № 2. - P. 397–407.
107. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway / Han J.M. [et al.] // *Cell*. - 2012. - Vol. 149. - № 2. - P. 410–424.
108. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis / Hansson G.K. [et al.] // *Circulation Research*. - 2002. - Vol. 91. - № 4. - P. 281–291.
109. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation / Hatzistergos K.E. [et al.] // *Circulation Research*. - 2010. - Vol. 107. - № 7. - P. 913–922.
110. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis / Hofstetter H.H. [et al.] // *Cellular Immunology*. - 2005. - Vol. 237. - № 2. - P. 123–130.
111. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin / Hoogduijn M.J. [et al.] // *Transplantation*. - 2008. - Vol. 86. - № 9. - P. 1283–1291.
112. Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4⁺ CD45RO⁺ T cells / Hsu S.-C. [et al.] // *Immunobiology*. - 2013. - Vol. 218. - № 1. - P. 90–95.
113. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) downregulates the cell surface expression of the CD4 molecule / Huang G. [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2012. - Vol. 13. - № 9. - P. 10863–10879.
114. HLA-G and immune tolerance in pregnancy / Hunt J.S. [et al.] // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. - 2005. - Vol. 19. - № 7. - P. 681–693.
115. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair / Imberti B. [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. - 2007. - Vol. 18. - № 11. - P. 2921–2928.

116. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells / Infante-Duarte C. [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 2000. - Vol. 165. - № 11. - P. 6107–6115.
117. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model / Inoue S. [et al.] // *Transplantation*. - 2006. - Vol. 81. - № 11. - P. 1589–1595.
118. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment / Ip J.E. [et al.] // *Molecular Biology of the Cell*. - 2007. - Vol. 18. - № 8. - P. 2873–2882.
119. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment / Iso Y. [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2007. - Vol. 354. - № 3. - P. 700–706.
120. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. / Iwalewa E.O. [et al.] // *African Journal of Biotechnology*. - 2007. - Vol. 6. - № 25. P. 2868-2885
121. Iyer S.S. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies / Iyer S.S., Rojas M. // *Expert Opinion on Biological Therapy*. - 2008. - Vol. 8. - № 5. - P. 569–581.
122. Javazon E.H. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging / Javazon E.H., Beggs K.J., Flake A.W. // *Experimental Hematology*. - 2004. - Vol. 32. - № 5. - P. 414–425.
123. Johnson B.A. Targeting the immunoregulatory indoleamine 2,3 dioxygenase pathway in immunotherapy / Johnson B.A., Baban B., Mellor A.L. // *Immunotherapy*. - 2009. - Vol. 1. - № 4. - P. 645–661.
124. Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay / Jones L.J. [et al.] // *Journal of Immunological Methods*. - 2001. - Vol. 254. - № 1–2. - P. 85–98.
125. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Growth and Repair / Kalinina N.I. [et al.] // *Acta Naturae*. - 2011. - Vol. 3. - № 4. - P. 30–37.
126. CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis / Kang Y.M.[et al.]. // *The Journal of Experimental Medicine*. - 2002. - Vol. 195. - № 10. - P. 1325–1336.
127. Bone marrow PDGFR α +Sca-1+-enriched mesenchymal stem cells support survival of and antibody production by plasma cells in vitro through IL-6 / Kayaba A. [et al.] // *International Immunology*. - 2018. - Vol. 30. - № 6. - P. 241–253.
128. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions / Keating A. // *Cell Stem Cell*. - 2012. - Vol. 10. - № 6. - P. 709–716.
129. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope / Kent S.C. [et al.]. // *Nature*. - 2005. - Vol. 435. - № 7039. - P. 224–228.
130. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation / Kikly K.[et al.] // *Current Opinion in Immunology*. - 2006. - Vol. 18. - № 6. - P. 670–675.
131. Tonsil-derived mesenchymal stem cells (T-MSCs) prevent Th17-mediated autoimmune response via regulation of the programmed death-1/programmed death ligand-1 (PD-1/PD-L1) pathway / Kim J.-Y. [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. - 2018. - Vol. 12. - № 2. - P. e1022–e1033.
132. Kim W.-U. cell proliferative response to type II collagen in the inflammatory process and joint damage in patients with rheumatoid arthritis / Kim W.-U., Kim K.-J // *The Journal of Rheumatology*. - 2005. - Vol. 32. - № 2. - P. 225–230.

133. King N.J. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase / King N.J., Thomas S.R. // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. - 2007. - Vol. 39. - № 12. - P. 2167–2172.
134. Klimczak A. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis / Klimczak A., Kozłowska U. // *Stem Cells International*. - 2016. - Vol. 2006. - P. 4285215.
135. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression / Klyushnenkova E. [et al.]. // *Journal of Biomedical Science*. - 2005. - Vol. 12. - № 1. - P. 47–57.
136. Kolaczowska E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / Kolaczowska E., Kubes P. // *Nature Reviews. Immunology*. - 2013. - Vol. 13. - № 3. - P. 159–175.
137. Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide / Kong S.K. [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1996. - Vol. 93. - № 8. - P. 3377–3382.
138. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory anti-gen-specific T cells to their cognate peptide / Krampera M. [et al.] // *Blood*. - 2003. - Vol. 101. - № 9. - P. 3722–3729.
139. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma / Kuperman D.A. [et al.] // *Nature Medicine*. - 2002. - Vol. 8. - № 8. - P. 885–889.
140. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmli U.K. // *Nature*. - 1970. - Vol. 227. - № 525 -P. 680–685.
141. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles / Lai R.C. [et al.] // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. - 2010. - Vol. 48. - № 6. - P. 1215–1224.
142. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells / Le Blanc K. [et al.] // *Experimental Hematology*. - 2003. - Vol. 31. - № 10. - P. 890–896.
143. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response / Le Blanc K., Davies L.C. // *Immunology Letters*. - 2015. - Vol. 168. - № 2. - P. 140–146.
144. Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus / Lee J.-H. [et al.] // *Immunology*. - 2006. - Vol. 117. - № 2. - P. 280–286.
145. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 / Lee R.H. [et al.] // *Cell Stem Cell*. - 2009. - Vol. 5. - № 1. - P. 54–63.
146. Neutrophil-macrophage interaction: a paradigm for chronic inflammation / Lefkowitz D.L. [et al.] // *Medical Hypotheses*. - 1995. - Vol. 44. - № 1. - P. 58–62.
147. Leventis P.A. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes / Leventis P.A., Grinstein S // *Annual Review of Biophysics*. - 2010. - Vol. 39. - P. 407–427.
148. CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice / Li J.-G. [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. - 2016. - Vol. 11. - № 3. - P. 878–884.

149. Li M.O. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10 / Li M.O., Flavell R.A. // *Immunity*. - 2008. - Vol. 28. - № 4. - P. 468–476.
150. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses / Li W. [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. - 2012. - Vol. 19. - № 9. - P. 1505–1513.
151. Cell-cell contact with proinflammatory macrophages enhances the immunotherapeutic effect of mesenchymal stem cells in two abortion models / Li Y. [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. - 2019. - doi:10.1038/s41423-019-0204-6
152. Li Y. Mesenchymal stem cells are injured by complement after their contact with serum / Li Y., Lin F. // *Blood*. - 2012. - Vol. 120. - № 17. - P. 3436–3443.
153. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study / Liang J. [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. - 2010. - Vol. 69. - № 8. - P. 1423–1429.
154. Impaired lymphatic contraction associated with immunosuppression / Liao S. [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2011. - Vol. 108. - № 46. - P. 18784–18789.
155. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms / Libby P. // *The American Journal of Clinical Nutrition*. - 2006. - Vol. 83. - № 2. - P. 456S-460S.
156. Libby P. Inflammation and atherosclerosis / Libby P., Ridker P.M., Maseri A. // *Circulation*. - 2002. - Vol. 105. - № 9. - P. 1135–1143.
157. PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T cell Activation and a T cell Differentiation Signal / Liechtenstein T. [et al.] // *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. 2012. - doi:10.4172/2155-9899.S12-006.
158. Induction of Immunogenic Cell Death in Lymphoma Cells by Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium / Lin D.H. [et al.] // *Stem Cell Reviews*. - 2017. - Vol. 13. - № 6. - P. 801–816.
159. Umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of circulating T follicular helper cells in patients with primary Sjögren's syndrome through the secretion of indoleamine 2,3-dioxygenase / Liu R. [et al.] // *Rheumatology (Oxford, England)*. - 2015. - Vol. 54. - № 2. - P. 332–342.
160. Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation / Liu X. [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. - 2012. - Vol. 189. - № 3. - P. 1182–1192.
161. MSCs inhibit bone marrow-derived DC maturation and function through the release of TSG-6 / Liu Y. [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2014. - Vol. 450. - № 4. - P. 1409–1415.
162. Bimodal effect of nitric oxide in the enzymatic activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocytic cells / López A.S. [et al.] // *Immunology Letters*. - 2006. - Vol. 106. - № 2. - P. 163–171.
163. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis / Lucchinetti C.F. [et al.] // *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*. - 1996. - Vol. 6. - № 3. - P. 259–274.
164. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population / Lucchini G. [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. - 2010. - Vol. 16. - № 9. - P. 1293–1301.

165. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma / Lukacs N.W. [et al.] // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. - 1994. - Vol. 10. - № 5. - P. 526–532.
166. Luo H.R. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation / Luo H.R., Loison F. // *American Journal of Hematology*. - 2008. - Vol. 83. - № 4. - P. 288–295.
167. Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway / Luz-Crawford P. [et al.] // *PloS One*. - 2012. - Vol. 7. - № 9. - P. e45272.
168. Immunobiology of mesenchymal stem cells / Ma S. [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. - 2014. - Vol. 21. - № 2. - P. 216–225.
169. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation ameliorates nephritis in lupus mice via inhibition of B-cell activation / Ma X. [et al.] // *Cell Transplantation*. - 2013. - Vol. 22. - № 12. - P. 2279–2290.
170. Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells inhibit Neutrophil Extracellular Traps through TSG-6 / Magaña-Guerrero F.S. [et al.] // *Scientific Reports*. - 2017. - Vol. 7. - № 1. - P. 12426.
171. Mailankot M. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon-gamma in human lens epithelial cells: apoptosis through the formation of 3-hydroxykynurenine / Mailankot M., Nagaraj R.H // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. - 2010. - Vol. 42. - № 9. - P. 1446–1454.
172. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration / Majka S.M. [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. - 2003. - Vol. 111. - № 1. - P. 71–79.
173. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells / Majumdar M.K. [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. - 2003. - Vol. 10. - № 2. - P. 228–241.
174. Mándi Y. The kynurenine system and immunoregulation / Mándi Y., Vécsei L. // *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*. - 2012. - Vol. 119. - № 2. - P. 197–209.
175. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage / Mangan P.R.[et al.] // *Nature*. - 2006. - Vol. 441. - № 7090. - P. 231–234.
176. Marrack P. Autoimmune disease: why and where it occurs / Marrack P., Kappler J., Kotzin B.L. // *Nature Medicine*. - 2001. - Vol. 7. - № 8. - P. 899–905.
177. Martins-Green M. Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing / Martins-Green M., Petreaca M., Wang L. // *Advances in Wound Care*. - 2013. - Vol. 2. - № 7. - P. 327–347.
178. The Effects of Anti-CD3/CD28 Coated Beads and IL-2 on Expanded T Cell for Immunotherapy / Martkamchan S. [et al.] // *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*. - 2016. - Vol. 25. - № 5. - P. 821–828.
179. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis / Matusevicius D. [et al.] // *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. - 1999. - Vol. 5. - № 2. - P. 101–104.
180. Messina J.P. Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase / Messina J.P., Lawrence D.A. // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. - 1989. - Vol. 143. - № 6. - P. 1974–1981.

181. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan / Metz R. [et al.] // *Oncoimmunology*. - 2012. - Vol. 1. - № 9. - P. 1460–1468.
182. Milner C.M. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? / Milner C.M., Higman V.A., Day A.J. // *Biochemical Society Transactions*. - 2006. - Vol. 34. - № Pt 3. - P. 446–450.
183. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors / Mo I.F. [et al.] // *BMC cell biology*. - 2008. - Vol. 9. - P. 52.
184. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study / Mohyeddin Bonab M. [et al.] // *Iranian journal of immunology: IJI*. - 2007. - Vol. 4. - № 1. - P. 50–57.
185. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling / Mokarizadeh A. [et al.] // *Immunology Letters*. - 2012. - Vol. 147. - № 1–2. - P. 47–54.
186. Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses / Moll G. [et al.] // *PloS One*. - 2011. - Vol. 6. - № 7. - P. e21703.
187. Moll N.M., Ransohoff R.M. CXCL12 and CXCR4 in bone marrow physiology // *Expert Review of Hematology*. 2010. № 3 (3). C. 315–322.
188. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells / Morgan M.E. [et al.] // *Arthritis and Rheumatism*. - 2005. - Vol. 52. - № 7. - P. 2212–2221.
189. Morigi M. Cell therapy for kidney injury: different options and mechanisms--mesenchymal and amniotic fluid stem cells / Morigi M., De Coppi P. // *Nephron. Experimental Nephrology*. - 2014. - Vol. 126. - № 2. - P. 59.
190. Mosser D.M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / Mosser D.M., Edwards J.P. // *Nature Reviews. Immunology*. - 2008. - Vol. 8. - № 12. - P. 958–969.
191. The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure / Movafagh A. [et al.] // *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. - 2011. - Vol. 10. - № 4. - P. 895–903.
192. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection / Mullen A.C. [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. - 2001. - Vol. 292. - № 5523. - P. 1907–1910.
193. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase / Munn D.H. [et al.] // *Immunity*. - 2005. - Vol. 22. - № 5. - P. 633–642.
194. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis / Murphy J.M. [et al.] // *Arthritis and Rheumatism*. - 2002. - Vol. 46. - № 3. - P. 704–713.
195. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells / Najar M. [et al.] // *Cytotherapy*. - 2016. - Vol. 18. - № 2. - P. 160–171.
196. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression / Nasef A. [et al.] // *Cellular Immunology*. - 2008. - Vol. 253. - № 1–2. - P. 16–22.
197. Nathan C. Points of control in inflammation / Nathan C. // *Nature*. - 2002. - Vol. 420. - № 6917. - P. 846–852.

198. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production / Németh K. [et al.] // *Nature Medicine*. - 2009. - Vol. 15. - № 1. - P. 42–49.
199. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells / Newman R.E. [et al.] // *Inflammation & Allergy Drug Targets*. - 2009. - Vol. 8. - № 2. - P. 110–123.
200. Sepsis-induced changes in macrophage co-stimulatory molecule expression: CD86 as a regulator of anti-inflammatory IL-10 response / Newton S. [et al.] // *Surgical Infections*. - 2004. - Vol. 5. - № 4. - P. 375–383.
201. Nishimura S. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome / Nishimura S., Manabe I., Nagai R. // *Discovery Medicine*. - 2009. - Vol. 8. - № 41. - P. 55–60.
202. Nombela-Arrieta C. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells / Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L.E. // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. - 2011. - Vol. 12. - № 2. - P. 126–131.
203. Expression of adhesion molecules in human intestinal graft-versus-host disease / Norton J. [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. - 1992. - Vol. 87. - № 2. - P. 231–236.
204. Adipose-derived stromal cells inhibit allergic airway inflammation in mice / Park H.-K. [et al.] // *Stem Cells and Development*. - 2010. - Vol. 19. - № 11. - P. 1811–1818.
205. Shift toward T helper 1 cytokines by type II collagen-reactive T cells in patients with rheumatoid arthritis / Park S.H. [et al.] // *Arthritis and Rheumatism*. - 2001. - Vol. 44. - № 3. - P. 561–569.
206. Peluso I. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication / Peluso I., Pallone F., Monteleone G. // *World Journal of Gastroenterology*. - 2006. - Vol. 12. - № 35. - P. 5606–5610.
207. T cell responses: naive to memory and everything in between / Pennock N.D. [et al.] // *Advances in Physiology Education*. - 2013. - Vol. 37. - № 4. - P. 273–283.
208. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / Pittenger M.F. [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. - 1999. - Vol. 284. - № 5411. - P. 143–147.
209. Pober J.S. Evolving functions of endothelial cells in inflammation / Pober J.S., Sessa W.C. // *Nature Reviews. Immunology*. - 2007. - Vol. 7. - № 10. - P. 803–815.
210. Podolsky D.K. Inflammatory bowel disease / Podolsky D.K. // *The New England Journal of Medicine*. - 2002. - Vol. 347. - № 6. - P. 417–429.
211. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens / Potian J.A. [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. - 2003. - Vol. 171. - № 7. - P. 3426–3434.
212. Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer / Prendergast G.C. [et al.] // *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. - 2014. - Vol. 63. - № 7. - P. 721–735.
213. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction / Prevosto C. [et al.] // *Haematologica*. - 2007. - Vol. 92. - № 7. - P. 881–888.
214. Pryor W.A. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide / Pryor W.A., Squadrito G.L. // *The American Journal of Physiology*. - 1995. - Vol. 268. - № 5 Pt 1. - P. L699-722.

215. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I / Puel A. [et al.]. // *The Journal of Experimental Medicine*. - 2010. - Vol. 207. - № 2. - P. 291–297.
216. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury / Puglisi M.A. [et al.] // *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. - 2011. - <http://dx.doi.org/10.1155/2011/860578>
217. Induction of Regulatory B-Cells by Mesenchymal Stem Cells is Affected by SDF-1 α -CXCR7 / Qin Y. [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. - 2015. - Vol. 37. - № 1. - P. 117–130.
218. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? / Rabinovich G.A. [et al.] // *Trends in Immunology*. - 2002. - Vol. 23. - № 6. - P. 313–320.
219. Rabinovich G.A. Turning «sweet» on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation / Rabinovich G.A., Toscano M.A. // *Nature Reviews. Immunology*. - 2009. - Vol. 9. - № 5. - P. 338–352.
220. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche / Raffaghello L. [et al.] // *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. - 2008. - Vol. 26. - № 1. - P. 151–162.
221. Mesenchymal Stromal Stem Cell-Derived Microvesicles Enhance Tumor Lysate Pulsed Dendritic Cell Stimulated Autologous T lymphocyte Cytotoxicity / Rahmani Kukia N. [et al.] // *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. - 2018. - Vol. 19. - № 7. - P. 1895–1902.
222. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17 / Rangachari M. [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. - 2006. - Vol. 203. - № 8. - P. 2009–2019.
223. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells / Rasmusson I. [et al.] // *Transplantation*. - 2003. - Vol. 76. - № 8. - P. 1208–1213.
224. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells / Rasmusson I. // *Experimental Cell Research*. - 2006. - Vol. 312. - № 12. - P. 2169–2179.
225. Rees A.J. Monocyte and macrophage biology: an overview / Rees A.J. // *Seminars in Nephrology*. - 2010. - Vol. 30. - № 3. - P. 216–233.
226. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide / Ren G. [et al.] // *Cell Stem Cell*. - 2008. - Vol. 2. - № 2. - P. 141–150.
227. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression / Ren G. [et al.] // *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. - 2009. - Vol. 27. - № 8. - P. 1954–1962.
228. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression / Ren G. [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. - 2010. - Vol. 184. - № 5. - P. 2321–2328.
229. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells / Ribeiro A. [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. - 2013. - Vol. 4. - № 5. - P. 125.
230. A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells / Rizzo R. [et al.] // *Cytotherapy*. - 2008. - Vol. 10. - № 4. - P. 364–375.
231. Ecto-5'-nucleotidase in B-cell chronic lymphocytic leukemia / Rosi F. [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. - 2002. - Vol. 56. - № 2. - P. 100–104.

232. Ross S.H. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes / Ross S.H., Cantrell D.A. // *Annual Review of Immunology*. - 2018. - Vol. 36. - P. 411–433.
233. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity / Rouas-Freiss N. [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1997. - Vol. 94. - № 21. - P. 11520–11525.
234. Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells / Rubtsov Y.P. [et al.] // *Acta Naturae*. - 2012. - Vol. 4. - № 1. - P. 23–31.
235. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants / Ruggeri L. [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. - 2002. - Vol. 295. - № 5562. - P. 2097–2100.
236. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells / Rüster B. [et al.] // *Blood*. - 2006. - Vol. 108. - № 12. - P. 3938–3944.
237. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection / Ryan J.M. [et al.] // *Journal of Inflammation (London, England)*. - 2005. - Vol. 2. - P. 8.
238. Induction of Indoleamine 2,3-dioxygenase by Pre-treatment with Poly(I:C) May Enhance the Efficacy of MSC Treatment in DSS-induced Colitis / Ryu D.-B. [et al.] // *Immune Network*. - 2016. - Vol. 16. - № 6. - P. 358–365.
239. Sackstein R. The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cell homing / Sackstein R. // *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*. - 2004. - Vol. 9. - № 3. - P. 215–223.
240. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone / Sackstein R. [et al.] // *Nature Medicine*. - 2008. - Vol. 14. - № 2. - P. 181–187.
241. Sad S. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines / Sad S., Marcotte R., Mosmann T.R. // *Immunity*. - 1995. - Vol. 2. - № 3. - P. 271–279.
242. Therapeutic potential of human mesenchymal stromal cells secreted components: a problem with standardization / Sagaradze G.D. [et al.] // *Biomeditsinskaia Khimiia*. - 2015. - Vol. 61. - № 6. - P. 750–759.
243. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease / Sakaguchi S. [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. - 1985. - Vol. 161. - № 1. - P. 72–87.
244. T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases / Sakaguchi S. [et al.] // *Journal of Autoimmunity*. - 1996. - Vol. 9. - № 2. - P. 211–220.
245. Sarkar S. Dendritic cells in rheumatoid arthritis / Sarkar S., Fox D.A. // *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. - 2005. - Vol. 10. - P. 656–665.
246. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells / Sato K. [et al.] // *Blood*. - 2007. - Vol. 109. - № 1. - P. 228–234.
247. Interferon- γ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus / Schena F. [et al.] // *Arthritis and Rheumatism*. - 2010. - Vol. 62. - № 9. - P. 2776–2786.

248. Schmid-Schönbein G.W. Nitric oxide (NO) side of lymphatic flow and immune surveillance / Schmid-Schönbein G.W. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2012. - Vol. 109. - № 1. - P. 3–4.
249. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms / Segers V.F. [et al.] // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. - 2006. - Vol. 290. - № 4. - P. H1370-1377.
250. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model / Semedo P. [et al.] // *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. - 2009. - Vol. 27. - № 12. - P. 3063–3073.
251. Serhan C.N. Resolution of inflammation: the beginning programs the end / Serhan C.N., Savill J. // *Nature Immunology*. - 2005. - Vol. 6. - № 12. - P. 1191–1197.
252. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice / Shi M. [et al.] // *Haematologica*. - 2007. - Vol. 92. - № 7. - P. 897–904.
253. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair / Shi Y. [et al.] // *Cell Research*. - 2010. - Vol. 20. - № 5. - P. 510–518.
254. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses / Shi Y. [et al.] // *Trends in Immunology*. - 2012. - Vol. 33. - № 3. - P. 136–143.
255. da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. // *Journal of Cell Science*. - 2006. - Vol. 119. - № Pt 11. - P. 2204–2213.
256. Singer N.G. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation / Singer N.G., Caplan A.I. // *Annual Review of Pathology*. - 2011. - Vol. 6. - P. 457–478.
257. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation / Sioud M. [et al.] // *Scandinavian Journal of Immunology*. - 2010. - Vol. 71. - № 4. - P. 267–274.
258. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration / Smith A. [et al.] // *Immunological Reviews*. - 2007. - Vol. 218. - P. 135–146.
259. Measurement of protein using bicinchoninic acid / Smith P.K. [et al.] // *Analytical Biochemistry*. - 1985. - Vol. 150. - № 1. - P. 76–85.
260. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2 / Spaggiari G.M. [et al.] // *Blood*. - 2008. - Vol. 111. - № 3. - P. 1327–1333.
261. Sprague A.H. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease / Sprague A.H., Khalil R.A. // *Biochemical Pharmacology*. - 2009. - Vol. 78. - № 6. - P. 539–552.
262. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell / Stagg J. [et al.] // *Blood*. - 2006. - Vol. 107. - № 6. - P. 2570–2577.
263. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system / Steinman L. // *Cell*. - 1996. - Vol. 85. - № 3. - P. 299–302.
264. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase / Sugimoto H. [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2006. - Vol. 103. - № 8. - P. 2611–2616.

265. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus / Sun L. [et al.] // *Arthritis and Rheumatism*. - 2010. - Vol. 62. - № 8. - P. 2467–2475.
266. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population / Svobodova E. [et al.] // *Stem Cells and Development*. - 2012. - Vol. 21. - № 6. - P. 901–910.
267. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment / Szabo S.J. [et al.] // *Cell*. - 2000. - Vol. 100. - № 6. - P. 655–669.
268. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes / Tabera S. [et al.] // *Haematologica*. - 2008. - Vol. 93. - № 9. - P. 1301–1309.
269. The Therapeutic Effect of ICAM-1-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells on Acute Graft-Versus-Host Disease / Tang B. [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. - 2018. - Vol. 46. - № 6. - P. 2624–2635.
270. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation / Tataru R. [et al.] // *Cytherapy*. - 2011. - Vol. 13. - № 6. - P. 686–694.
271. Taupin P. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals / Taupin P., Gage F.H. // *Journal of Neuroscience Research*. - 2002. - Vol. 69. - № 6. - P. 745–749.
272. Taylor-Robinson A. W. Functional characterization of protective CD4+ T-cell clones reactive to the murine malaria parasite *Plasmodium chabaudi* / Taylor-Robinson A.W., Phillips R.S. // *Immunology*. - 1992. № 1 (77). C. 99–105.
273. Tham E.L. Activation-induced nonresponsiveness: a Th-dependent regulatory check-point in the CTL response / Tham E.L., Shrikant P., Mescher M.F. // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). - 2002. - Vol. 168. - № 3. - P. 1190–1197.
274. Human neutrophils in auto-immunity / Thieblemont N. [et al.] // *Seminars in Immunology*. - 2016. - Vol. 28. - № 2. - P. 159–173.
275. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction / Timmers L. [et al.] // *Stem Cell Research*. - 2011. - Vol. 6. - № 3. - P. 206–214.
276. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor / Toksoz D. [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992. - Vol. 89. - № 16. - P. 7350–7354.
277. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function / Tomita S. [et al.] // *Circulation*. - 1999. - Vol. 100. - № 19 Suppl. - P. II247-256.
278. Torok-Storb B. Cellular interactions / Torok-Storb B. // *Blood*. - 1988. - Vol. 72. - № 2. - P. 373–385.
279. Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1979. - Vol. 76. - № 9. - P. 4350–4354.
280. Treadwell M. D. Increased neutrophil adherence to endothelial cells exposed to asbestos / Treadwell M.D., Mossman B.T., Barchowsky A. // *Toxicology and Applied Pharmacology*. - 1996. - Vol. 139. - № 1. - P. 62–70.

281. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation / Tse W.T. [et al.] // *Transplantation*. - 2003. - Vol. 75. - № 3. - P. 389–397.
282. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H / Tu Z. [et al.] // *Stem Cells and Development*. - 2010. - Vol. 19. - № 11. - P. 1803–1809.
283. Galectin-9 is a suppressor of T and B cells and predicts the immune modulatory potential of mesenchymal stromal cell preparations / Ungerer C. [et al.] // *Stem Cells and Development*. - 2014. - Vol. 23. - № 7. - P. 755–766.
284. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions / Varol C. [et al.] // *Immunity*. - 2009. - Vol. 31. - № 3. - P. 502–512.
285. Veale D.J. Cell adhesion molecules in rheumatoid arthritis / Veale D.J., Maple C. // *Drugs & Aging*. - 1996. - Vol. 9. - № 2. - P. 87–92.
286. van der Veen R.C. Nitric oxide and T helper cell immunity / van der Veen R.C. // *International Immunopharmacology*. - 2001. - Vol. 1. - № 8. - P. 1491–1500.
287. Velnar T. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms / Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. // *The Journal of International Medical Research*. - 2009. - Vol. 37. - № 5. - P. 1528–1542.
288. Verma N.K. Not Just an Adhesion Molecule: LFA-1 Contact Tunes the T Lymphocyte Program / Verma N.K., Kelleher D. // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. - 2017. - Vol. 199. - № 4. - P. 1213–1221.
289. Molecular Genetic Analysis of Human Endometrial Mesenchymal Stem Cells That Survived Sublethal Heat Shock / Vinogradov A.E. [et al.] // *Stem Cells International*. - Vol. 2017. - <https://doi.org/10.1155/2017/2362630>.
290. Wahl S.M. Spontaneous production of fibroblast-activating factor(s) by synovial inflammatory cells. A potential mechanism for enhanced tissue destruction / Wahl S.M., Malone D.G., Wilder R.L. // *The Journal of Experimental Medicine*. - 1985. - Vol. 161. - № 1. - P. 210–222.
291. A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA) / Wallace W.A. [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. - 1995. - Vol. 101. - № 3. - P. 436–441.
292. Walling B.L. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation / Walling B.L., Kim M. // *Frontiers in Immunology*. - 2018. - Vol. 9. - P. 952.
293. Walport M.J. Complement. Second of two parts / Walport M.J. // *The New England Journal of Medicine*. - 2001. - Vol. 344. - № 15. - P. 1140–1144.
294. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study / Wang D. [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. - 2014. - Vol. 16. - № 2. - P. R79.
295. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture / Wang L. [et al.] // *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*. - 2002. - Vol. 7. - № 2. - P. 113–117.
296. p53 Activation by nitric oxide involves down-regulation of Mdm2 / Wang X. [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2002. - Vol. 277. - № 18. - P. 15697–15702.
297. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype / Waterman R.S. [et al.] // *PloS One*. - 2010. - Vol. 5. - № 4. - P. e10088.

298. Suppression of Canine Dendritic Cell Activation/Maturation and Inflammatory Cytokine Release by Mesenchymal Stem Cells Occurs Through Multiple Distinct Biochemical Pathways / Wheat W.H. [et al.] // *Stem Cells and Development*. - 2017. - Vol. 26. - № 4. - P. 249–262.
299. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow / Wynn R.F. [et al.] // *Blood*. - 2004. - Vol. 104. - № 9. - P. 2643–2645.
300. Xavier R.J., Podolsky D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease / Xavier R.J., Podolsky D.K. // *Nature*. - 2007. - Vol. 448. - № 7152. - P. 427–434.
301. The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity / Xue Q. [et al.] // *Stem Cells and Development*. - 2010. - Vol. 19. - № 1. - P. 27–38.
302. Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor / Yabuki M. [et al.] // *Free Radical Research*. - 2000. - Vol. 32. - № 6. - P. 507–514.
303. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells / Yao Z. [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. - 1995. - Vol. 155. - № 12. - P. 5483–5486.
304. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors / Young H.E. [et al.] // *The Anatomical Record*. - 2001. - Vol. 264. - № 1. - P. 51–62.
305. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy / Zappia E. [et al.] // *Blood*. - 2005. - Vol. 106. - № 5. - P. 1755–1761.
306. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes / Zhang B. [et al.] // *Stem Cells and Development*. - 2014. - Vol. 23. - № 11. - P. 1233–1244.
307. SOCS1 regulates the immune modulatory properties of mesenchymal stem cells by inhibiting nitric oxide production / Zhang L. [et al.] // *PLoS One*. - 2014. - Vol. 9. - № 5. - P. e97256.
308. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Function of Dendritic Cells by Secreting Galectin-1 / Zhang Y. [et al.] // *BioMed Research International*. - 2017. - Vol. 0217. - <https://doi.org/10.1155/2017/3248605>
309. Phytohemagglutinin improves efficiency of electrofusing mammary gland epithelial cells into oocytes in goats / Zhang Y.L. [et al.] // *Theriogenology*. - 2008. - Vol. 69. - № 9. - P. 1165–1171.
310. Mesenchymal stromal cells augment CD4+ and CD8+ T-cell proliferation through a CCL2 pathway / Zhou Y. [et al.] // *Cytotherapy*. - 2013. - Vol. 15. - № 10. - P. 1195–1207.
311. Zhu X.-Y. Concise review: mesenchymal stem cell treatment for ischemic kidney disease / Zhu X.-Y., Lerman A., Lerman L.O. // *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. - 2013. - Vol. 31. - № 9. - P. 1731–1736.
312. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation / Ziegler-Heitbrock L. // *Journal of Leukocyte Biology*. - 2007. - Vol. 81. - № 3. - P. 584–592.
313. Interleukin-1 β : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis / Zunszain P.A. [et al.] // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. - 2012. - Vol. 37. - № 4. - P. 939–949.