

Doi: 10.31116/tsitol.2018.05.03

## РОЛЬ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ В ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ В ММСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

© Ю. Г. Суздальцева,<sup>1</sup> К. В. Горюнов,<sup>2</sup> Ю. П. Рубцов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, 119991, и

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119192;

<sup>1</sup> электронный адрес: yu\_suzdaltseva@mail.ru

Моделирование взаимодействия мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) и активированных иммунных клеток *in vitro* является важным этапом в исследовании молекулярных механизмов воспаления и регенерации тканей. В наших экспериментальных условиях мы показали, что при сокультивировании в контактных и бесконтактных условиях ММСК, выделенные из жировой ткани человека, подавляют пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови (МПК), активированных фитогемагглютинином (ФГА). Установлено, что активация приводит к повышению способности Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> образовывать адгезивные контакты с ММСК. Выявлено, что при сокультивировании с активированными МПК в ММСК повышаются синтез и экспонирование на поверхности молекулы адгезии ICAM-1, а также индуцируется синтез молекул CD80, CD86 и HLA-DR, которые участвуют в образовании межклеточных контактов с Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> посредством взаимодействия с их контррецептрами LFA1 и CTLA4/CD28. Показано, что возникновение межклеточных контактов приводит к увеличению продукции интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> и индукции синтеза индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) в ММСК. Полученные данные позволяют прояснить механизм иммуносупрессии, опосредованной ММСК, с участием контактных взаимодействий с активированными Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup>.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, мононуклеарные клетки периферической крови, межклеточные контакты.

Принятые сокращения: ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, МПК и актМПК — соответственно мононуклеарные клетки периферической крови и активированные МПК, IDO — индоламин-2,3-диоксигеназа.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) человека являются удобным инструментом для решения задач регенеративной медицины. В последнее время много внимания уделялось изучению способности ММСК к замещению тканевых дефектов за счет дифференцировки в различные типы клеток (костные, хрящевые и жировые) и к миграции в поврежденные ткани. Последние исследования выявили существование дополнительных механизмов, посредством которых ММСК проявляют свой терапевтический потенциал, включая паракринные воздействия, а также иммуномодуляторные свойства.

Во время фазы воспаления в очаге поражения ММСК оказывают иммуносупрессивное действие. В ряде экспериментальных систем было установлено, что ММСК блокируют пролиферацию активированных Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток, супрессируют созревание дендритных клеток, индуцируют увеличение популяции регуляторных Т-клеток (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3), способствуют снижению секреции иммуноглобулинов В-клетками и др. (Rubtsov et al., 2012; Glenn, Whartenby, 2014; Le Burel et al., 2017; Contreras-Kallens et al., 2017).

В механизмах, определяющих иммуносупрессивный потенциал ММСК, могут быть задействованы как растворимые факторы, так и непосредственные межклеточные контакты между ними и клетками иммунной системы (Rasmusson, 2006; Ren et al., 2010; Espagnolle et al., 2017).

Среди потенциальных растворимых факторов, выделяемых ММСК в очаге воспаления и определяющих эффект иммуносупрессии, рассматривают IDO, индуцируемую NO-синтазу, циклооксигеназу-2, простагландин E2, лиганд программируемой смерти 1 (PD-L1) и др. (Bernardo, Fibbe, 2013; Glenn, Whartenby, 2014). Однако в последнее время предполагается также участие молекул межклеточного взаимодействия в проявлении этого эффекта.

В настоящей работе мы исследовали влияние межклеточных контактов на способность ММСК жировой ткани проявлять иммуносупрессивное действие по отношению к мононуклеарным клеткам периферической крови (МПК), активированных фитогемагглютинином (ФГА). Мы показали, что ММСК подавляют пролиферацию активированных МПК (актМПК) при сокультивировании в

контактных и бесконтактных условиях *in vitro*. Далее был проведен анализ субпопуляций актМПК, которые при контактном сокультивировании образовывали плотные межклеточные контакты с ММСК. Было выявлено, что этой способностью обладают Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup>. Мы показали, что сокультивирование с актМПК в контактных условиях приводит к усилению синтеза молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 в ММСК. В этих же условиях в ММСК происходит индукция синтеза лейкоцитарного антигена II класса (HLA-DR) человека и костимуляторных молекул CD80 и CD86. Взаимодействие рецепторной пары ICAM-1 и Т-клеточного LFA1 имеет важное значение в регуляции синтеза IFN- $\gamma$ , повышенная продукция которого была обнаружена при контактном сокультивировании ММСК и актМПК. С другой стороны, IFN- $\gamma$  в совокупности с сигналом в виде взаимодействия молекул CD80/CD86 на поверхности ММСК и Т-клеточными поверхностными молекулами CTLA4/CD28 индуцировал синтез фермента IDO в ММСК, вовлеченный в один из механизмов подавления пролиферации активированных лимфоцитов. Таким образом, установлена роль межклеточных контактов в провоспалительном микроокружении, в ответ на воздействие которых в ММСК синтезируются растворимые факторы, играющие важную роль в проявлении механизмов иммуносупрессии.

## Материал и методика

Выделение, культивирование и дифференцировка ММСК жировой ткани. ММСК из подкожной жировой ткани человека выделяли с помощью ферментативной обработки по описанному методу (Zuc et al., 2002). Измельченную жировую ткань инкубировали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ед./мл; Worthington Biochemical, США) и диспазы (40 ед./мл; Sigma, Германия) при 37 °С в течение 30—45 мин. Затем добавляли равный объем стандартной среды для культивирования DMEM/F12 (HyClone, США), содержащей 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2 мМ глютамина, 1 мМ пирувата натрия (HyClone) и 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США). Полученный образец центрифугировали, осадок ресуспендировали в стандартной среде культивирования и высаживали на чашки Петри (Corning Costar, США) при плотности посева  $5 \cdot 10^4$  фрагментов ткани на 1 см<sup>2</sup>. Смену стандартной среды культивирования проводили каждые 2—3 сут до достижения плотности монослоя 70—80 %. Дифференцировку полученных клеток в остеобласты, хондробласты и адипоциты проводили по известным методикам (Suzdal'tseva et al., 2007b).

Выделение и активация МПК. С информированного согласия здоровых доноров 25—50 мл периферической крови из локтевой вены забирали в стерильные флаконы, содержащие ЭДТА (1.5 мг/мл крови, pH 7.2). МПК выделяли в градиенте плотности Ficoll Paque® ( $\rho = 1.077$  г/см<sup>3</sup>, Pharmacia Biotech, США). Для активирования МПК использовали ФГА (Sigma, США). Для этого МПК инкубировали в среде DMEM/F12 (HyClone, США) без сыворотки, содержащей ФГА в концентрации 10 мкг/мл, в течение 2 ч при 37 °С. Затем суспензию клеток центрифугировали, осадок ресуспендировали в стандартной среде культивирования.

Анализ пролиферации актМПК в сокультуре с ММСК. ММСК культивировали в стандартной

среде в 12-луночных планшетах при начальной плотности посева 12 тыс. кл. на 1 см<sup>2</sup> при 37 °С в течение 48 ч. Затем среду культивирования заменяли на свежую и добавляли актМПК. ММСК и актМПК сокультивировали в различных соотношениях (1 : 100, 1 : 50, 1 : 25 соответственно) в контактных и бесконтактных условиях в течение 48 ч при 37 °С. Для контактного сокультивирования добавляли суспензию актМПК непосредственно к монослою ММСК. Бесконтактное сокультивирование клеток осуществляли, используя полупроницаемые мембраны (trans-wells) с диаметром поры 0.4 мкм (Greiner, Германия).

Для исследования способности ММСК угнетать пролиферацию актМПК использовали CyQUANT®NF Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, США). Для этого сокультивировали ММСК и актМПК в указанных соотношениях 1—6 сут при 37 °С. Затем супернатант, содержащий МПК, центрифугировали, ресуспендировали полученный осадок в однократном растворе Хенкса, добавляли к клеткам флуоресцентный краситель CyQUANT®NF или пермеабилizующий агент для установки базового фона и инкубировали в темноте 1 ч при 37 °С. МПК, культивируемые в стандартной среде, использовали для построения калибровочной кривой зависимости сигнала флуоресценции от числа клеток. Интенсивность флуоресценции измеряли при 530 нм на приборе ZENYTH 3100 (Biochrom, Великобритания).

Проточная цитометрия. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток на поверхностные маркеры мезенхимных стромальных и гемопоэтических клеток проводили с помощью антител к CD105, CD73, CD90, CD34, CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, CD16, CD56, CD19, CD11a, CD80, CD86 и HLA-DR, конъюгированных с флуорохромами фикоэритрином (PE), Alexa Fluor 488, аллофикоцианином (APC) и пиридинхлорофиллом (Per-CP) (BD Bioscience, США), по инструкции фирмы-производителя. Образцы анализировали на проточном цитометре FACS CANTO II (BD Bioscience, США). Данные обрабатывали с помощью пакета программ FLOWJO.

Оценка способности МПК к образованию межклеточных контактов с ММСК. АктМПК и интактные МПК сокультивировали в контактных условиях с ММСК в течение 48 ч в соотношении 1 : 100. Неприкрепившиеся клетки отмывали раствором Хенкса. Прикрепившиеся клетки (ММСК и МПК) обрабатывали 5 мин раствором Qtase (HyClone, США) при 37 °С, ресуспендировали, добавляли стандартную среду культивирования для инактивации фермента и осаждали центрифугированием. Иммуноцитохимическое окрашивание прикрепившихся клеток проводили с помощью антител, конъюгированных с флуорохромами BD Multitest™ 6-Color TBNK Reagent; (BD Bioscience, США), по инструкции фирмы-производителя. Образцы анализировали на проточном цитометре FACS CANTO II (BD Bioscience, США). Данные обрабатывали с помощью пакета программ FLOWJO.

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Определяли уровень экспрессии генов молекул адгезии N-кадгерина, Т-кадгерина, Р-кадгерина, Е-селектина, Р-селектина, L-селектина, ICAM-1, молекулы адгезии сосудистого эндотелия (VCAM), тромбоцитарно-эндотелиальной молекулы адгезии (PECAM), а также IDO отдельно в ММСК и актМПК. Для этого актМПК сокультивировали в контактных условиях с

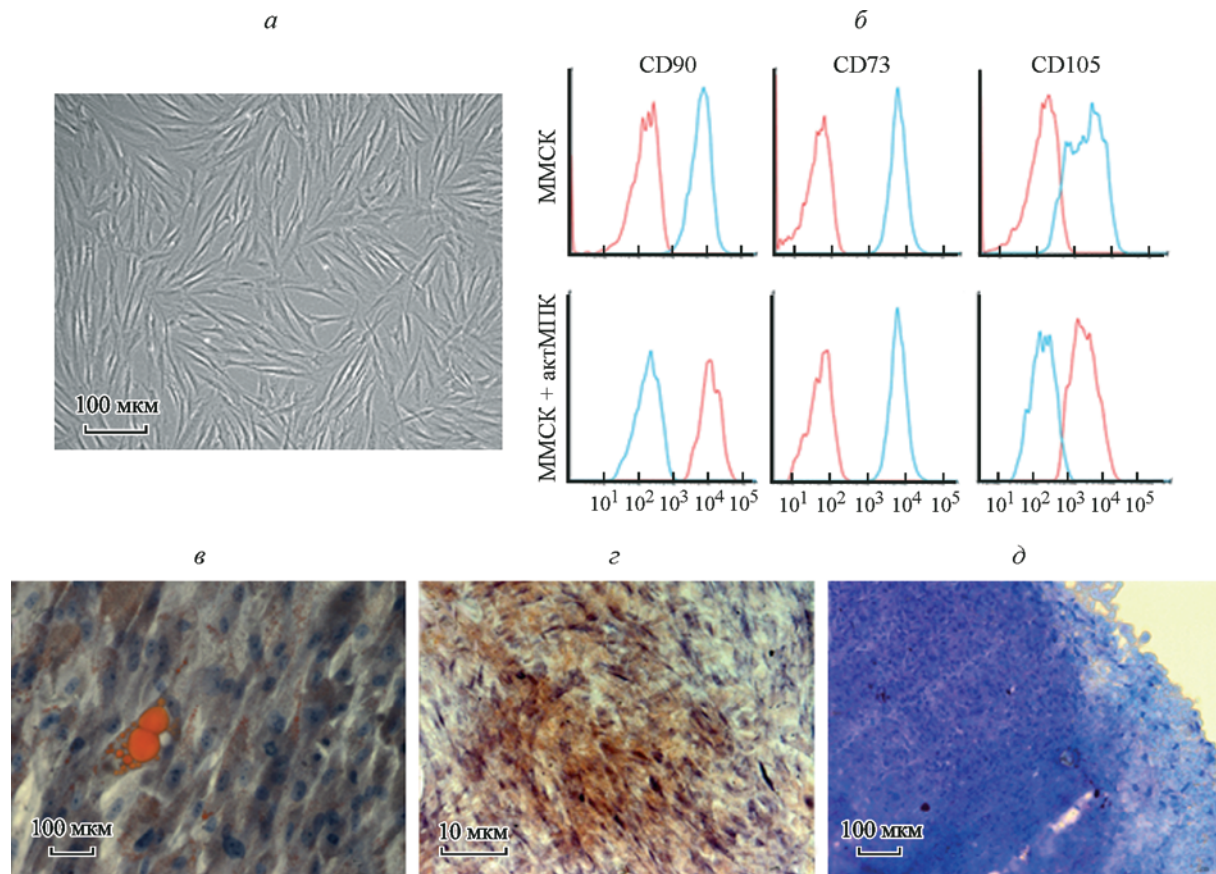


Рис. 1. Морфологическая характеристика, иммуноцитотипический профиль и дифференцировочный потенциал ММСК жировой ткани.

*а* — ММСК, адгезионная культура 2-го пассажа с фибробластоподобной морфологией; *б* — проточная флуориметрия ММСК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам CD90, CD73 и CD105, конъюгированных с флуорохромами аллофикоцианином (APC), Alexa Fluor 488 и фикоэритрином (PE) соответственно; *красным цветом* показан изотипический контроль, *синим* — специфические поверхностные маркеры. *в* — накопление жировых вакуолей в ММСК, окраска масляным красным и гематоксилином. *г* — накопление минерализованного матрикса в ММСК, окраска ализариновым красным. *д* — образование хрящевых микромасс ММСК при культивировании клеток в среде дифференцировки в хондроциты в течение 21 сут, криосрезы окрашены толуидиновым голубым.

ММСК в течение 48 ч в соотношении 1 : 25. Контрольными образцами служили интактные ММСК и МПК. Затем супернатант сокультур и контрольного образца МПК собирали. МПК осаждали центрифугированием. Из образцов ММСК и МПК отдельно выделяли РНК, добавляя Trisol (Invitrogen, США). Обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени проводили по стандартным методикам. Уровень транскрипции молекул адгезии и IDO в клетках нормировали к уровню экспрессии  $\beta$ -актина в соответствующих образцах.

Анализ продукции цитокинов в сокультуре ММСК и МПК. Сокультивирование ММСК и актМПК (в соотношении 1 : 100) проводили, как описано выше для анализа пролиферации актМПК. Через 48 ч собирали супернатант сокультуры, содержащий актМПК, которые осаждали центрифугированием. Анализ содержания цитокинов в супернатанте сокультур проводили с помощью иммуноанализатора Bio-Plex 200 по инструкции к прибору с использованием набора Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad, США).

Статистический анализ. Для сравнения двух независимых групп использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $P < 0.05$ . Расчеты выполняли в программе Statistica 6.0.

## Результаты

Характеристика ММСК жировой ткани. Выделенные из подкожной жировой клетчатки клетки, прикрепившиеся к поверхности культурального пластика, имели фибробластоподобную морфологию, обладали способностью к экспансии (рис. 1, *а*). Под действием специальных условий (Suzdal'tseva et al., 2007b) эти клетки обладали способностью дифференцироваться в адипоциты, хондробласты и остеобласты (рис. 1, *в—д*). Анализ фенотипа клеток полученной культуры методом проточной цитометрии показал, что они экспрессируют поверхностные маркеры ММСК CD105, CD73 и CD90 (рис. 1, *б*) и не экспрессируют поверхностных маркеров гемопоэтических клеток CD34, CD45 и HLA-DR (данные не представлены). Иммуноцитотипический и функциональный анализ позволяет утверждать, что выделенные клетки соответствуют критериям, предложенным для определения ММСК Международным обществом по клеточной терапии (ISCT, 2006). Мы также установили, что сокультивирование с актМПК в течение 48 ч не влияет на мезенхимный фенотип ММСК (рис. 1, *б*).

Активация МПК ФГА. МПК активировали ФГА (10 мкг/мл), окрашивали флуоресцентномечеными антителами к маркерам Т-лимфоцитов (CD4, CD25 и CD69) и

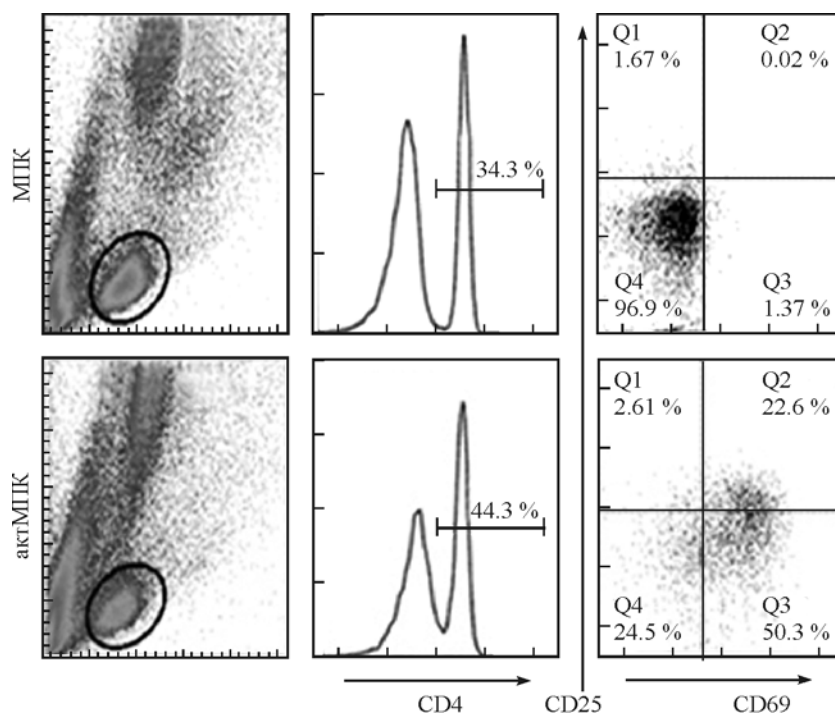


Рис. 2. Активация МПК фитогемагглютинином. Данные проточной цитометрии.

Репрезентативные результаты анализа МПК, окрашенных антителами к поверхностным маркерам Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и маркерам активации Т-лимфоцитов CD25 и CD69.

анализировали методом проточной цитометрии. Было отмечено, что активация МПК приводит к увеличению доли Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, несущих на поверхности высокий уровень маркеров активации CD25 (альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2) и CD69 (маркера ранней активации Т-лимфоцитов) (рис. 2).

ММСК подавляют пролиферацию активированных МПК. Способность ММСК жировой ткани подавлять пролиферацию актМПК исследовали с использованием системы смешанных культур. Мы установили, что ММСК в наибольшей степени подавляют пролиферацию актМПК через 48 ч сокультивирования. При больших временах сокультивирования эффект был менее выражен (данные не представлены). Поэтому дальнейшие измерения проводили через 48 ч сокультивирования. Степень подавления пролиферации актМПК в присутствии ММСК зависела от соотношения этих клеток в

культуре. При соотношениях ММСК и МПК 1 : 100 и 1 : 50 существенного подавления пролиферации актМПК не выявлено (рис. 3).

Наиболее значительное подавление пролиферации актМПК наблюдали при соотношении клеток 1 : 25. Статистических различий между степенью подавления пролиферации актМПК при наличии и отсутствии контактов между ММСК и МПК в сокультуре не было, однако при наличии межклеточных контактов подавление пролиферации актМПК было все же больше, чем без них. Полученные результаты позволяют предположить, что в описываемых эффектах основную роль играют растворимые факторы, однако межклеточные контакты также вносят определенный вклад.

Нами также выявлено, что растворимые факторы, содержащиеся в супернатантах интактных культур ММСК, не влияют на пролиферацию актМПК. Этот результат

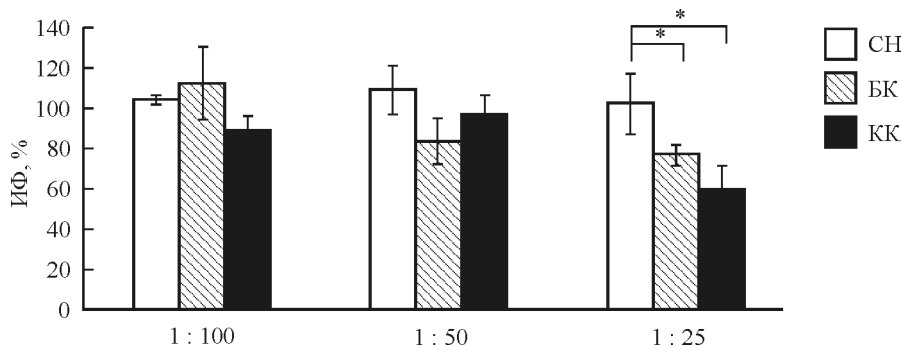


Рис. 3. ММСК жировой ткани подавляют пролиферацию актМПК при сокультивировании клеток в соотношениях 1 : 100, 1 : 50 и 1 : 25 в бесконтактных (БК) и контактных (КК) условиях.

Контролем служили актМПК, культивируемые в супернатанте (СН) от ММСК. Данные нормированы к уровню пролиферации (100 %) актМПК в стандартной среде культивирования. Показаны средние величины и их ошибки из 5 независимых экспериментов измерений интенсивности флуоресценции CyQUANT®NF (ИФ). Звездочка показывает достоверность различий при  $P < 0.05$ .

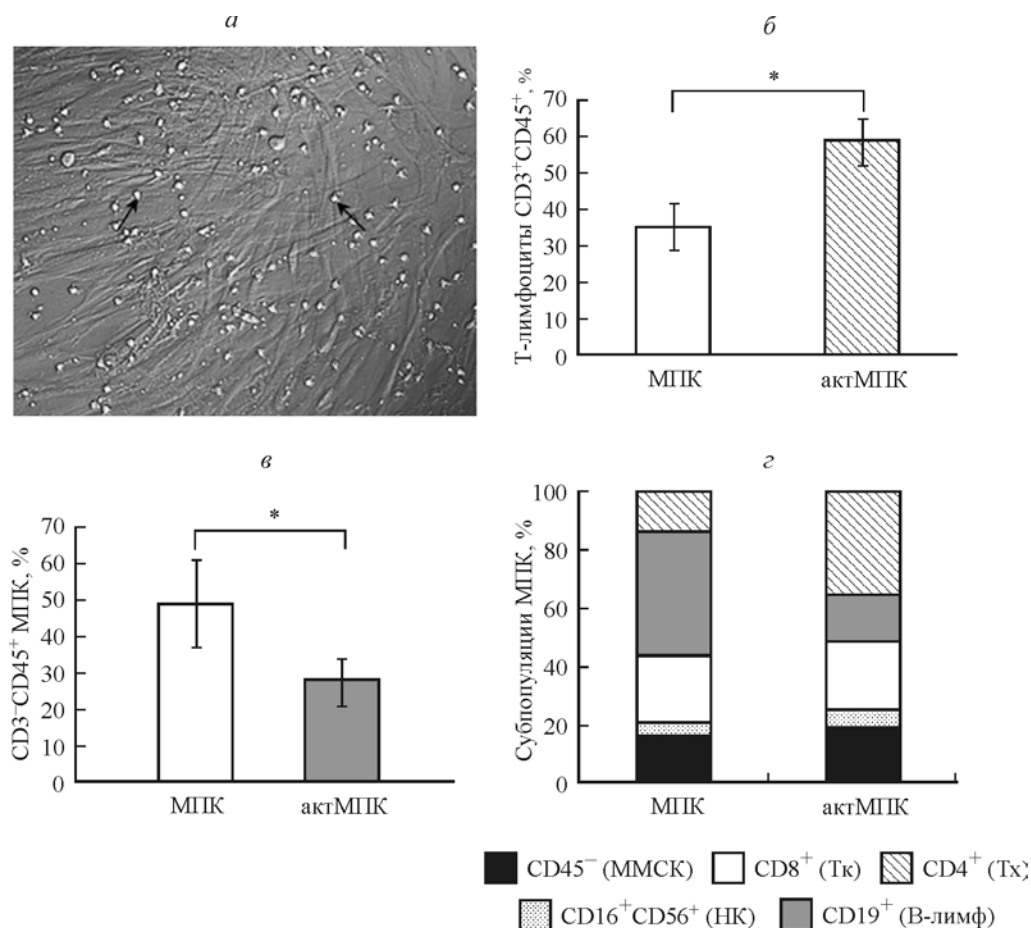


Рис. 4. Активация МПК добавлением 10 мкг/мл ФГА способствует усилению их способности образовывать контакты с ММСК жировой ткани.

*a* — фотография ММСК после сокультивирования с актМПК, стрелками указаны МПК, образовавшие плотные контакты с ММСК. *б* — доля Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, связавшихся с ММСК, в % от общего количества МПК CD45<sup>+</sup>. *в* — доля МПК CD3<sup>-</sup>, связавшихся с ММСК, в % от общего количества МПК CD45<sup>+</sup>. *г* — распределение субпопуляций МПК, связавшихся с ММСК при сокультивировании: Тх (Т-хелперы), Тк (Т-киллерные клетки), НК (натуральные киллерные клетки). На гистограммах представлены средние величины (*б*—*г*) и их ошибки (*б*, *в*) из 9 независимых экспериментов (звездочка показывает достоверность различий при  $P < 0.05$ ).

указывает на то, что ММСК не секретируют иммуносупрессивные факторы в стандартных условиях культивирования, а только в ответ на стимулы, поступающие от актМПК.

Активация приводит к возрастанию способности Т-лимфоцитов образовывать плотные межклеточные контакты с ММСК. Оценку способности субпопуляций МПК образовывать плотные межклеточные контакты с ММСК проводили в контактных сокультурах. Для этого связавшиеся с ММСК актМПК и интактные МПК анализировали с помощью метода проточной цитометрии, инкубируя их с флуоресцентными антителами на общий лейкоцитарный антиген (CD45), маркеры Т-лимфоцитов (CD3, CD4 и CD8), а также на маркеры натуральных киллеров (CD16 и CD56) и В-лимфоцитов (CD19) (рис. 4, *a*).

Проведенные эксперименты показали, что активация МПК приводит к увеличению их способности образовывать межклеточные контакты с ММСК. Иммуноцитопенотипирование показало, что этот эффект обеспечивается определенными субпопуляциями МПК, большинство же других не участвует в этом процессе. В условиях эксперимента активация МПК приводила к увеличению доли Т-лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>), связавшихся с ММСК

(рис. 4, *б*). В то же время среди клеток субпопуляции CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (не Т-лимфоцитов) способность образовывать межклеточные контакты с ММСК жировой ткани при активации ФГА снижалась (рис. 4, *в*). Дальнейший анализ субпопуляций Т-лимфоцитов, связавшихся с ММСК, показал, что при активации способность к установлению межклеточных контактов с ММСК значительно повышается у Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, а у Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup> не изменяется (рис. 4, *г*).

Таким образом, мы предполагаем, что контактные взаимодействия между активированными Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> и ММСК, возможно, могут являться одним из важных факторов, участвующих в стимуляции иммуносупрессивных свойств ММСК.

Анализ потенциальных молекул, участвующих в образовании межклеточных контактов между ММСК и актМПК при сокультивировании. Основными белками, участвующими в образовании межклеточных контактов, являются молекулы адгезии. Для того чтобы установить, какие молекулы адгезии могут участвовать в образовании межклеточных контактов между ММСК и актМПК при сокультивировании в контактных условиях, исследовали уровень экспрессии генов ICAM-1, VCAM, PECAM, N-кадгерина,

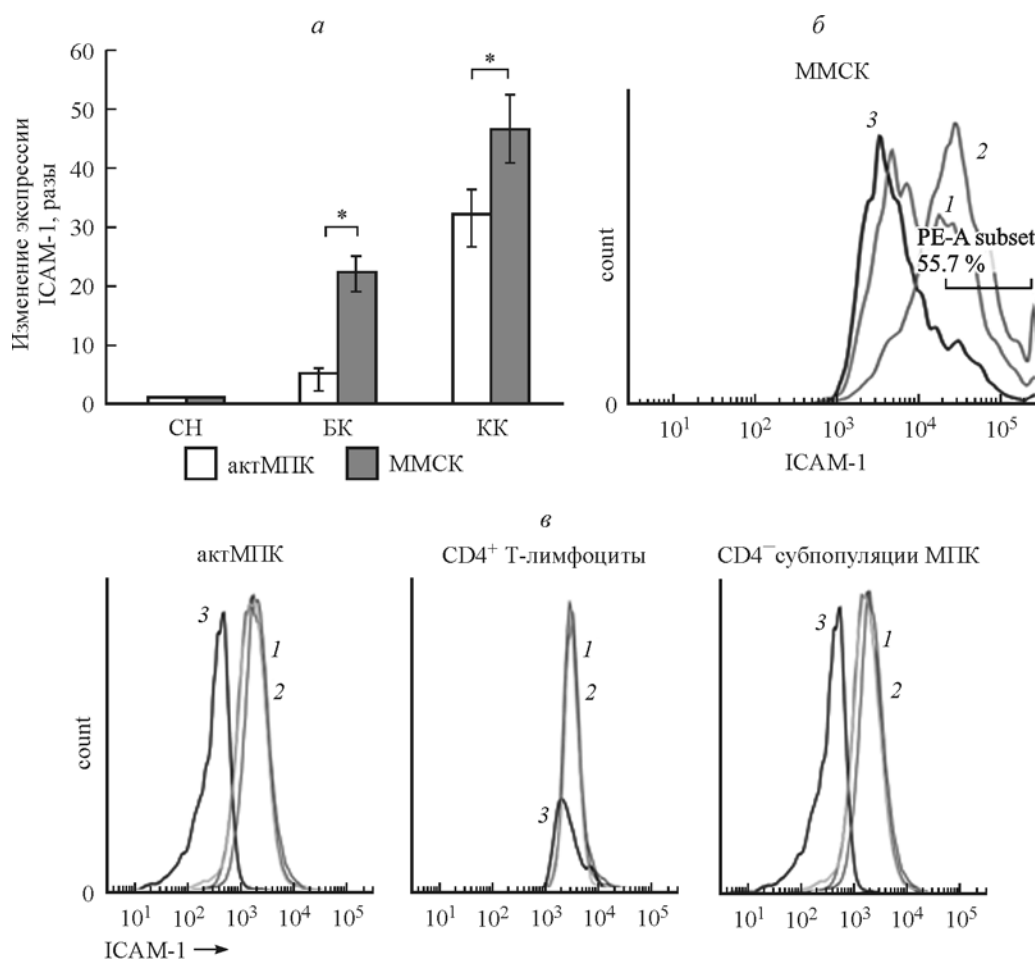


Рис. 5. Изменение уровня экспрессии ICAM-1 в ММСК жировой ткани и в актМПК при их совместном бесконтактном (БК) и контактном (КК) культивировании.

*а* — относительные изменения уровня экспрессии гена ICAM-1 в ММСК и актМПК (СН — супернатант); представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов (звездочка показывает достоверность различий при  $P < 0.05$ ). *б* — поверхностный маркер ICAM-1 на ММСК при их бесконтактном (кривая 1) и контактном (кривая 2) сокультивировании с актМПК, кривая 3 — изотипический контроль. *в* — поверхностный маркер ICAM-1, экспрессируемый актМПК и субпопуляциями МПК CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>-</sup>: обозначения кривых те же, что и на *б*.

Т-кадгерина, Р-кадгерина, Е-селектина, Р-селектина и L-селектина в каждом из указанных типов клеток отдельно. Для этого ММСК сокультивировали с актМПК в контактных и бесконтактных условиях в течение 48 ч. Затем супернатант, содержащий актМПК, отбирали и осаждали центрифугированием. Отдельно из ММСК и МПК выделяли мРНК и проводили обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени.

Основной функцией кадгеринов является обеспечение гомотипического соединения клеток в плотных тканях организма. В условиях контактного и бесконтактного сокультивирования с ММСК в актМПК не обнаружили экспрессии генов Е-, Т-, Р- и N-кадгеринов. В отличие от МПК в ММСК эти кадгерины экспрессировались, но уровень экспрессии снижался при сокультивировании с актМПК в контактных условиях (данные не приведены).

Из всех генов селектинов (Е-, Р- и L-селектина) в наших условиях сокультивирования в актМПК была обнаружена экспрессия только гена L-селектина. Последний конститутивно экспрессируется на лейкоцитах. В условиях контактного сокультивирования с ММСК в актМПК уровень экспрессии L-селектина возрастал, что указывает на возможность участия этого гена в установлении адге-

зивных контактов между клетками. Однако статистически достоверных различий между повышением уровня экспрессии гена L-селектина в актМПК в контактных и бесконтактных условиях сокультивирования с ММСК не обнаружено.

PECAM-1 конститутивно экспрессируется в основном в клетках эндотелия, однако обнаруживается также и в ММСК. При сокультивировании ММСК и актМПК мы не обнаружили экспрессии этого гена ни в ММСК, ни в актМПК. Таким образом, участие PECAM-1 в установлении контактов между клетками не обнаружено.

В отличие от постоянно экспрессирующейся в эндотелии молекулы PECAM-1 экспрессия гена VCAM-1 индуцируется в них провоспалительным микроокружением. Ранее нами было показано, что при культивировании в стандартных условиях в ММСК обнаруживается незначительное количество клеток, экспрессирующих VCAM-1 (Lupatov et al., 2006; Suzdal'tseva et al., 2007a). В настоящей работе мы не обнаружили закономерности изменения экспрессии гена VCAM-1 в ММСК при сокультивировании с актМПК в повторных экспериментах (данные не представлены). Экспрессии гена VCAM-1 в актМПК не обнаружено.

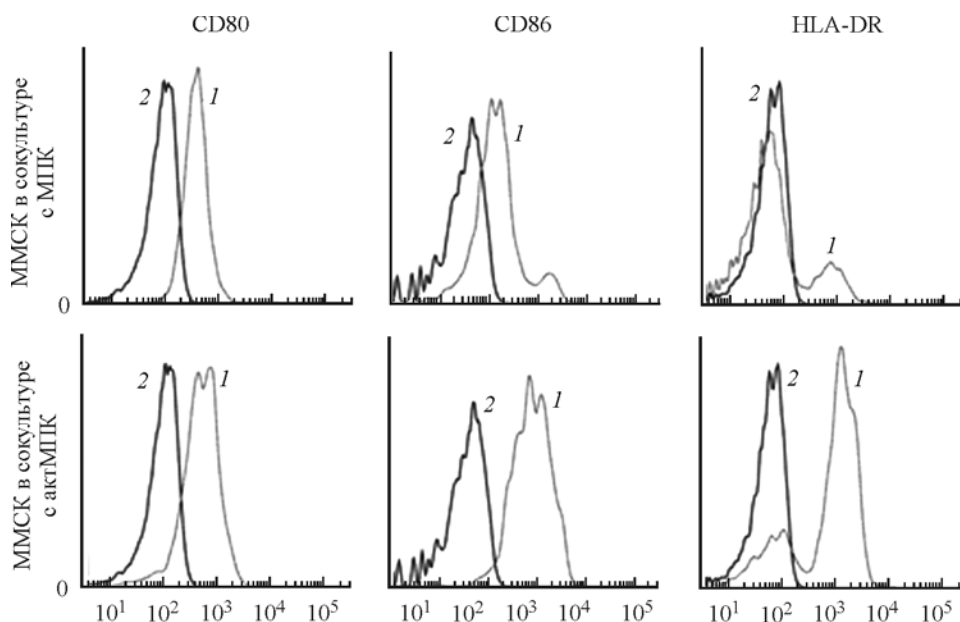


Рис. 6. Экспрессия поверхностных костимуляторных молекул CD80/CD86 и HLA-DR в MMCK жировой ткани (кривые 1) при сокультивировании с интактными МПК и актМПК в течение 48 ч.

Проточная цитометрия; кривые 2 — изотипический контроль.

Итак, полученные результаты указывают на то, что кадгерин, E- и P-селектин, PECAM-1 и VCAM-1 в установлении межклеточных контактов между актМПК и MMCK в наших экспериментальных условиях не участвуют.

Другой молекулой адгезии, синтез которой индуцируется провоспалительным микроокружением, в частности такими медиаторами воспаления, как IL-1, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , является ICAM-1. Проведенный нами анализ мРНК показал, что при сокультивировании уровень экспрессии гена ICAM-1 значительно возрастал и в MMCK, и в актМПК (рис. 5, а). С помощью проточной цитометрии было показано, что и экспонирование ICAM-1 на поверхности MMCK также драматически увеличивалось. Количество MMCK с высоким уровнем экспонирования ICAM-1 на поверхности было значительно выше при сокультивировании их с актМПК в контактных условиях по сравнению с бесконтактными (рис. 5, б). Однако данные проточной цитометрии показали, что уровень экспрессии ICAM-1 в субпопуляции Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> оставался стабильным. Уровень экспрессии ICAM-1 возрастал в основном в клетках субпопуляции CD4<sup>-</sup> (рис. 5, в). Этот факт указывает на то, что в установлении межклеточных контактов между Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> и MMCK участвует именно ICAM-1, экспрессирующийся на поверхности MMCK. Рецептором для ICAM-1 служит молекула LFA-1, которая экспрессирована на поверхности Т-лимфоцитов. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что рецепторная пара LFA-1 и ICAM-1 может являться потенциальной участницей установления плотных межклеточных контактов между MMCK и Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup>.

Другие молекулы, экспрессирующиеся на поверхности Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, также могут участвовать в процессе установления межклеточных контактов с MMCK. Мы показали, что при сокультивировании с актМПК в MMCK индуцируется синтез костимуляторных молекул CD80/CD86 и молекулы HLA-DR, характерных для дендритных клеток (рис. 6). Следовательно, среди по-

тенциальных молекул, участвующих в образовании межклеточных контактов, могут быть костимуляторные молекулы HLA-DR, CD80/CD86, с одной стороны, и Т-клеточные рецепторы (TCR), CTLA4/CD28 — с другой.

Сокультивирование MMCK и актМПК усиливает синтез IFN- $\gamma$ . Для того чтобы установить вероятную роль межклеточных контактов в индукции синтеза IFN- $\gamma$ , проводили анализ содержания цитокинов в супернатанте культур и сокультур MMCK и актМПК. Проведенные эксперименты показали, что в стандартных условиях отдельные культуры MMCK и актМПК продуцировали незначительное количество IFN- $\gamma$  (рис. 7). Сокультивирование MMCK и актМПК в контактных условиях приводило к значительному увеличению концентрации IFN- $\gamma$  в супернатанте. Изменение концентрации IFN- $\gamma$  в супернатанте бесконтактных сокультур не было статистически достоверным.

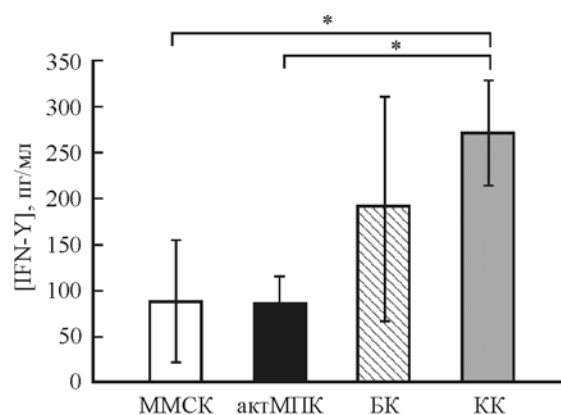


Рис. 7. Концентрации IFN- $\gamma$  в супернатантах актМПК и MMCK жировой ткани при раздельном и совместном бесконтактном (БК) и контактном (КК) культивировании.

Представлены средние величины и их ошибки из 6 независимых экспериментов (звездочка показывает достоверность различий при  $P < 0.05$ ).

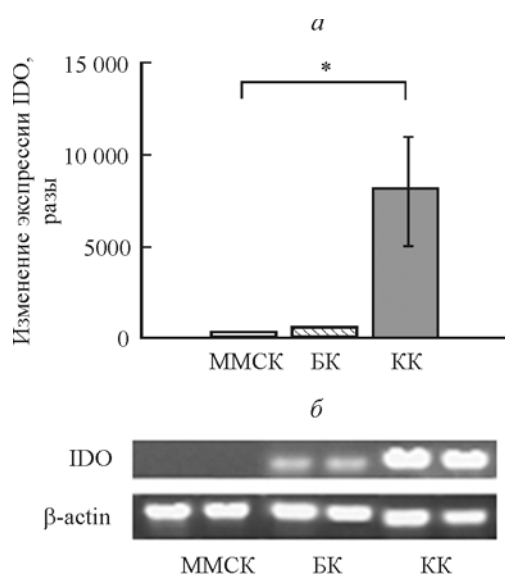


Рис. 8. Изменение экспрессии гена фермента IDO в ММСК жировой ткани при совместном бесконтактном (БК) и контактном (КК) культивировании с актМПК. ПЦР в реальном времени.

*a* — относительные изменения экспрессии, представлены средние величины и их ошибки из 3 независимых экспериментов (*звездочка* показывает достоверность различий при  $P < 0.05$ ); *б* — репрезентативная электрофореграмма продуктов ПЦР.

Индукция синтеза IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК. Для установления вероятной роли межклеточных контактов в индукции синтеза IDO анализировали содержание мРНК этого фермента в ММСК при контактном и бесконтактном сокультивировании с интактными МПК и актМПК. Было установлено, что ММСК не экспрессирует IDO конститутивно. Сокультивирование ММСК с актМПК приводит к индукции синтеза IDO в ММСК. Уровень мРНК IDO в ММСК был значительно повышен при контактном сокультивировании с актМПК при соотношении 1 : 25. При этом соотношении подавление пролиферации актМПК в присутствии ММСК было максимальным. Существенно более низкий уровень экспрессии IDO обнаружен в ММСК, сокультивированных с актМПК в бесконтактных условиях (рис. 8).

Тот факт, что уровень синтеза IDO в ММСК при сокультивировании с актМПК существенно выше в контактных условиях, чем в бесконтактных, указывает на то, что межклеточные взаимодействия играют существенную роль в индукции этого фермента в ММСК.

Полученные результаты позволяют предположить, что одним из основных механизмов иммуносупрессии, проявляемой ММСК при установлении прямых межклеточных контактов с активированными Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup>, является индукция синтеза IDO в ММСК.

## Обсуждение

Участие ММСК в регуляции процессов воспаления и регенерации поврежденных тканей в настоящее время активно изучается. Так, было показано, что ММСК обладают иммуносупрессивными свойствами и участвуют в регуляции воспалительных процессов (Singer, Caplan, 2011). При этом показано, что ММСК оказывают влияние практически на все субпопуляции иммунокомпетентных

клеток посредством как растворимых факторов, так и непосредственных межклеточных контактов (Di Nicola et al., 2002; Rasmussen, 2006; Sotiropoulou et al., 2006; Jung et al., 2007; Asari et al., 2009).

В последнее время получены данные, которые указывают на то, что ММСК подавляют пролиферацию актМПК (Bartholomew et al., 2002; Le Blanc et al., 2003b; Aggarwal, Pittenger, 2005). В наших экспериментальных условиях ММСК жировой ткани также подавляли пролиферацию актМПК. Этот эффект зависел от соотношения этих клеток и реализовывался за счет растворимых факторов и межклеточных взаимодействий. Анализ субпопуляций актМПК, связавшихся с ММСК при контактном сокультивировании, показал, что в основном эффект осуществлялся за счет Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>. Этот факт позволяет предположить участие контактов между Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> и ММСК в механизмах иммуносупрессии.

В образовании стабильных, но при этом динамических контактов между клетками могут участвовать такие молекулы адгезии, как кадгерины, селектины, PECAM-1, ICAM-1 и VCAM-1. Полученные нами результаты показали: экспрессия генов кадгеринов в ММСК снижается при сокультивировании с актМПК, что свидетельствует об уменьшении гомотипического взаимодействия между этими клетками и вызывает отделение их друг от друга. Этот факт может иметь отношение к предполагаемому механизму привлечения ММСК в очаг воспаления. Однако отсутствие экспрессии генов кадгеринов в актМПК указывает на то, что эти молекулы не участвуют в образовании контактов между ММСК и Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> в наших экспериментальных условиях. Селектины, PECAM-1, ICAM-1 и VCAM-1 вовлечены в механизмы адгезии в процессах хоуминга Т-лимфоцитов и их избирательного перемещения (роллинга) в ткани. Различают несколько основных механизмов взаимодействия рецептора с лигандом, участвующих в процессе взаимодействия Т-лимфоцитов с клетками других типов: Т-клеточный LFA1 (интегрин αLβ2, CD11a/CD18) связывается с ICAM-1, Т-клеточный VLA-4 (интегрин α4β1, CD49d/CD29) — с VCAM-1, сигнализированные карбогидраты Т-клеток — с Е-селектином (Shimizu et al., 1991).

Мы показали, что при контактном сокультивировании с актМПК уровень экспрессии ICAM-1 в ММСК существенно возрос, но оставался стабильным в субпопуляции Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> (рис. 5, *в*). В наших условиях сокультивирования ни актМПК, ни ММСК не синтезировали Е-селектин. А изменение уровня экспрессии VCAM-1 в ММСК при сокультивировании в контактных и бесконтактных условиях с актМПК не было статистически значимым. Известно, что провоспалительные медиаторы индуцируют синтез ICAM-1 во многих клетках и значительно повышают адгезию к ним Т-лимфоцитов через LFA1 (Springer, 1990; Ren et al., 2010). Однако повышенная способность к адгезии является следствием не увеличения уровня экспрессии этого гена, а качественными изменениями образующегося комплекса с ICAM-1 (Shimizu et al., 1991). Таким образом, можно предположить, что в наших экспериментальных условиях именно взаимодействие рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM-1, экспрессирующейся на ММСК, обеспечивало плотные контакты между клетками. Следовательно, полученные нами результаты показали, что только один из вышеперечисленных механизмов участвует в образовании плотных межклеточных контактов между активированными Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> и ММСК.



Однако существует другой механизм, вовлеченный в образование контактных взаимодействий между активированными Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> и ММСК. Показано, что провоспалительное микроокружение, в частности IFN- $\gamma$ , вызывает в ММСК индукцию синтеза HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86, экспрессия которых характерна для дендритных клеток (Bleijs et al., 1999; Le Blanc et al., 2003a). В наших условиях сокультивирование с актМПК тоже приводило к индукции синтеза HLA-DR и CD80/CD86 в ММСК. Взаимодействие между HLA-DR и CD80/CD86, экспрессирующимися на ММСК, и TCR и CTLA4/CD28, экспрессирующимися на поверхности Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, может участвовать в установлении контактов между этими клетками и в наших условиях.

Известно, что IFN- $\gamma$  и дополнительный сигнал в виде лигирования рецепторных пар CD80/CD86 и CTLA4/CD28 необходимы для индукции функциональной активности IDO в дендритных клетках (Munn et al., 2004). Активность фермента IDO, катализирующего превращение незаменимой аминокислоты триптофана в кинуренин, является одним из механизмов подавления пролиферации активированных лимфоцитов и обеспечивает супрессию нежелательного Т-клеточного ответа (Munn et al., 1999). Показано, что IFN- $\gamma$  индуцирует синтез IDO и в ММСК жировой ткани (DelaRosa et al., 2009).

Проведенные нами эксперименты показали, что установление контактов между ММСК и активированными Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> может приводить к активации механизма подавления пролиферации активированных лимфоцитов, сходного с дендритными клетками. В нем могут участвовать контакты, образованные взаимодействием как рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM-1 на ММСК, так и CTLA4/CD28 на поверхности Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD80/CD86 на ММСК.

Мы показали, что сокультивирование актМПК с ММСК в контактных условиях приводило к значительному повышению концентраций IFN- $\gamma$  в супернатанте (рис. 7) и что одновременно происходило повышение уровня экспрессии гена ICAM-1 в ММСК (рис. 5). Известно, что взаимодействие рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM1 играет важную роль в усилении синтеза IFN- $\gamma$  в МПК (Bleijs et al., 1999; Yoshida et al., 2002). Полученные нами результаты согласуются с данными из литературы (Cuerquis et al., 2014) о том, что подавлению пролиферации актМПК при сокультивировании с ММСК предшествует значительное повышение концентрации IFN- $\gamma$  в супернатанте в ранний период, которая при дальнейшем сокультивировании снижается. В аналогичных условиях нами обнаружены индукция синтеза IDO в ММСК (рис. 8) и максимальное подавление пролиферации актМПК (рис. 3). Однако ранее нами показано, что блокирование экспонированной на поверхности ММСК молекулы ICAM-1 специфическими антителами не влияет на уровень экспрессии IDO в ММСК (Rubtsov, 2017).

Следовательно, установление контактов между ММСК и Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> через CD80/CD86 и CTLA4/CD28 играет основную роль в индукции синтеза и функциональной активности IDO в ММСК, а связывание рецепторной пары Т-клеточный LFA1 и ICAM-1 может играть как прямую, так и опосредованную роль в индукции синтеза IDO через воздействие IFN- $\gamma$ . Таким образом, нами уточнен механизм подавления пролиферации активированных Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> с участием их контактных взаимодействий с ММСК.

В то же время подавление пролиферации Т-лимфоцитов при сокультивировании с ММСК в бесконтактных условиях указывает на альтернативные механизмы иммуносупрессии, опосредованной ММСК, в активации которых участвуют в основном растворимые факторы, синтезируемые клетками в ответ на провоспалительное микроокружение. Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение о том, что в условиях воспаления характер взаимодействия иммунных клеток с ММСК (удаленный или локальный) может влиять на индукцию различных сигнальных путей, определяющих иммуносупрессивный потенциал ММСК.

**Заключение.** Проведен анализ роли адгезивных взаимодействий между ММСК жировой ткани и МПК в подавлении пролиферации актМПК. Определена существенная роль межклеточных контактов (между активированными Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> и ММСК жировой ткани через ICAM-1 и CD80/CD86) в индукции синтеза и функциональной активности IDO в ММСК. Изучение молекулярных механизмов взаимодействия ММСК жировой ткани и иммунных клеток *in vitro* позволит определить ключевые факторы и установить терапевтические мишени, играющие принципиальную роль в регуляции процессов воспаления.

Авторы выражают особую благодарность проф. С. Л. Киселеву (Институт общей генетики РАН, Москва) за ценные советы и помощь в оформлении статьи.

#### Список литературы

- Aggarwal S., Pittenger M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105 : 1815—1822.
- Asari S., Itakura S., Ferreri K., Liu C. P., Kuroda Y., Kandel F., Mullen Y. 2009. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp. Hematol.* 37 : 604—615.
- Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., Moseley A., Hoffman R. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp. Hematol.* 30 : 42—48.
- Bernardo M. E., Fibbe W. E. 2013. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 13 : 392—402.
- Bleijs D. A., de Waal-Malefyt R., Figdor C. G., van Kooyk Y. 1999. Co-stimulation of T cells results in distinct IL-10 and TNF-alpha cytokine profiles dependent on binding to ICAM-1, ICAM-2 or ICAM-3. *Eur. J. Immunol.* 29 : 2248—2258.
- Contreras-Kallens P., Terraza C., Oyarce K., Gajardo T., Campos-Mora M., Barroilhet M. T., Alvarez C., Fuentes R., Figueroa F., Khoury M., Pino-Lagos K. 2017. Mesenchymal stem cells and their immunosuppressive role in transplantation tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 10.1111/nyas.13364.
- Cuerquis J., Romieu-Mourez R., Francois M., Routy J. P., Young Y. K., Zhao J., Eliopoulos N. 2014. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation. *Cytherapy*. 16 : 191—202.
- DelaRosa O., Lombardo E., Beraza A., Mancheno-Corvo P., Ramirez C., Menta R., Rico L., Camarillo E., Garcia L., Abad J. L., Trigueros C., Delgado M., Buscher D. 2009. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A*. 15 : 2795—2806.
- Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P. D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A. M. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced

by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 99 : 3838—3843.

Espagnolle N., Balguerie A., Arnaud E., Sensebe L., Varin A. 2017. CD54-Mediated interaction with pro-inflammatory macrophages increases the immunosuppressive function of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Reports*. 8 : 961—976.

Glenn J. D., Whartenby K. A. 2014. Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J. Stem Cells*. 6 : 526—539.

Jung Y. J., Ju S. Y., Yoo E. S., Cho S., Cho K. A., Woo S. Y., Seoh J. Y., Park J. W., Han H. S., Ryu K. H. 2007. MSC-DC interactions: MSC inhibit maturation and migration of BM-derived DC. *Cytotherapy*. 9 : 451—458.

Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringden O. 2003a. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol*. 31 : 890—896.

Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S. E., Ringden O. 2003b. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol*. 57 : 11—20.

Le Burel S., Thepenier C., Boutin L., Lataillade J. J., Peltzer J. 2017. Effect of mesenchymal stromal cells on T cells in a septic context: immunosuppression or Immunostimulation? *Stem Cells Develop*. 26 : 1477—1489.

Lupatov A. Y., Karalkin P. A., Suzdal'tseva Y. G., Burunova V. V., Yarygin V. N., Yarygin K. N. 2006. Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull. Exp. Biol. Med*. 142 : 521—526.

Munn D. H., Shafiqzadeh E., Attwood J. T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A. L. 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med*. 189 : 1363—1372.

Munn D. H., Sharma M. D., Mellor A. L. 2004. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4<sup>+</sup> T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol*. 172 : 4100—4110.

Rasmusson I. 2006. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res*. 312 : 2169—2179.

Ren G., Zhao X., Zhang L., Zhang J., L'Huillier A., Ling W., Roberts A. I., Le A. D., Shi S., Shao C., Shi Y. 2010. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J. Immunol*. 184 : 2321—2328.

Rubtsov Y., Goryunov K., Romanov A., Suzdal'tseva Y., Sharonov G., Tkachuk V. 2017. Molecular mechanisms of immunomodulation properties of mesenchymal stromal cells: a new insight into the role of ICAM-1. *Stem Cells Int*. 2017 : 6516854

Rubtsov Y. P., Suzdal'tseva Y. G., Goryunov K. V., Kalinina N. I., Sysoeva V. Y., Tkachuk V. A. 2012. Regulation of immunity via multipotent mesenchymal stromal cells. *Acta Naturae*. 4 : 23—31.

Shimizu Y., Newman W., Gopal T. V., Horgan K. J., Graber N., Beall L. D., van Seventer G. A., Shaw S. 1991. Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J. Cell Biol*. 113 : 1203—1212.

Singer N. G., Caplan A. I. 2011. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol*. 6 : 457—478.

Sotiropoulou P. A., Perez S. A., Gritzapis A. D., Baxevas C. N., Papamichail M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 24 : 74—85.

Springer T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346 : 425—434.

Suzdal'tseva Y. G., Burunova V. V., Petrakova N. V., Vakhru-shev I. V., Yarygin K. N., Yarygin V. N. 2007a. Comparative analysis of cytophenotypes of cells of mesenchymal lineage isolated from human tissues. *Bull. Exp. Biol. Med*. 143 : 147—154.

Suzdal'tseva Y. G., Burunova V. V., Vakhru-shev I. V., Yarygin V. N., Yarygin K. N. 2007b. Capability of human mesenchymal cells isolated from different sources to differentiation into tissues of mesodermal origin. *Bull. Exp. Biol. Med*. 143 : 114—121.

Yoshida A., Kohka Takahashi H., Iwagaki H., Yoshino T., Morichika T., Yokoyama M., Itoh H., Mori S., Akagi T., Nishibori M., Tanaka N. 2002. Essential role of ICAM-1/LFA-1 interaction in synergistic effect of IL-18 and IL-12 on IFN- $\gamma$  production in human PBMC. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 365 : 181—186.

Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell*. 13 : 4279—4295.

Поступила 2 II 2018

## THE ROLE OF INTERCELLULAR CONTACTS IN THE INDUCTION OF IDO EXPRESSION IN THE ADIPOSE DERIVED MMSCs

Yu. G. Suzdal'tseva,<sup>1</sup> K. V. Goryunov,<sup>2</sup> Yu. P. Rubtsov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, 119991, and

<sup>2</sup> Department of Medicine, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192;

<sup>1</sup> e-mail: yu\_suzdal'tseva@mail.ru

The investigation of interaction of human multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) and stimulated immune cells *in vitro* is an important step in understanding of molecular mechanisms of inflammation and tissue regeneration. In this study we have demonstrated that MMSCs derived from human adipose exhibit the immunosuppressive effect on proliferation of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by phytohemagglutinin in both contact and contactless co-culture. Co-culture enhanced the ability of stimulated CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes to form a stable adherens junction with MMSCs. Expression of membrane intercellular adhesion molecule (ICAM-1) in MMSCs was elevated upon co-cultivation with stimulated PBMCs. The pro-inflammatory microenvironment produced by stimulated PBMCs also induced the expression of costimulatory molecules CD80/CD86 in MMSCs. ICAM-1 and CD80/CD86 molecules expressed on the MMSCs surface participate in establishment of cell-cell contacts with CD4<sup>+</sup> T-cells through the interaction with their counter receptors LFA-1 and CTLA4/CD28. Intercellular interaction between stimulated CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes and MMSCs is responsible for enhanced production of IFN- $\gamma$  and the induction of expression and activation of indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO) in MMSC. Taking together, our findings shed a light on the mechanism underlying the immunosuppressive effects of MMSC depending on intercellular interactions with stimulated CD4<sup>+</sup>-lymphocytes.

**Key words:** human adipose derived mesenchymal stem cells, peripheral blood mononuclear cells, intercellular contacts.