

УДК 616.832-004.2:602.9:616-074:543.645

Динамика цитокинов у пациентов с рассеянным склерозом до и после клеточной терапии

М.М. Зафранская¹, Д.Б. Нижегородова¹, Г.И. Иванчик¹, А.В. Борисов², Г.В. Кожух³,
Е.А. Назарова, А.С. Федулов²

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь;

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;

³Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь,

⁴УЗ «9-ая ГКБ» г. Минска

Before and after cell therapy cytokines dynamics in multiple sclerosis patients

М.М. Zafranskaya¹, D.B. Nizheharodava¹, H.I. Ivanchyk¹, A.V. Borisov², G.V. Kozhuch³,
E.A. Nazarova⁴, A.S. Fedulau²,

¹Belarusian medical academy of post-graduate education, Minsk, Belarus;

²Belarusian state medical university, Minsk, Belarus;

³Republic research and production center for transfusiology and medical biotechnologies, Minsk, Belarus;

⁴Minsk City Hospital N9, Minsk, Belarus

Аннотация

Многочисленные публикации демонстрируют роль мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в качестве существенных модуляторов как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа в контексте воспаления и повреждения. В связи с этим современный метод клеточной терапии с использованием МСК представляет собой перспективный комплексный подход для комбинированного лечения рассеянного склероза (РС). В данной статье рассмотрено влияние клеточной терапии на синтез *in vitro* провоспалительных (γ ИФН, ФНО α) и противовоспалительных (ИЛ-10 и ТРФ β) цитокинов, баланс которых определяет развитие нейроиммунного воспаления при РС. Установлено, что у пациентов с РС МСК способны *in vitro* переключать профиль цитокинового синтеза с провоспалительного на регуляторный в условиях миелиновой стимуляции мононуклеаров периферической крови. После клеточной терапии иммуномодулирующий эффект МСК у пациентов с РС проявлялся в виде снижения продукции патогенетически значимых γ ИФН и ФНО α к 3-му – 6-м месяцам посттрансплантационного периода до уровней, сопоставимых с таковыми в *in vitro* условиях антиген-специфической стимуляции ко-культур лимфоцитов и МСК.

Ключевые слова

Мезенхимальные стволовые клетки, рассеянный склероз, клеточная терапия, фактор некроза опухоли α , интерферон γ , интерлейкин-10, трансформирующий ростовой фактор β

Summary

Broad-spectrum of publications has demonstrated mesenchymal stem cells (MSC) role as the important modulator of the both innate and adaptive immune responses under inflammation and damage conditions. Thereby up-to-day method of MSC therapy corresponds the promising complex approach to the multiple sclerosis (MS) combined treatment. This article examines *in vitro* cell therapy effect on pro-inflammatory (γ IFN, TNF α) and anti-inflammatory (IL-10, TGF β) cytokines synthesis, the balance of which determines the neuroimmune inflammation development. It was established in MS patients that MSC are capable to switch the profile of *in vitro* cytokines' synthesis from pro-inflammatory to regulatory in myelin-stimulated peripheral blood mononuclear cells. The immunomodulatory effect of MSC in MS patients was expressed as the decrease of pathogenically important γ IFN and TNF α production to 3^d-6th months after treatment up to levels comparable with that under *in vitro* antigen-specific stimulation of lymphocytes and MSC co-cultures.

Keywords

Mesenchymal stem cells, multiple sclerosis, cell therapy, tumor necrosis factor α , interferon γ , interleukin-10, transforming growth factor β

Рассеянный склероз (РС) представляет собой воспалительное демиелинизирующее аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), характеризующееся периваскулярным воспалением и высоким уровнем циркулирующих Т- и В-лимфоцитов, способных повреждать компоненты миелина [1]. По мере развития заболевания в области белого вещества мозга формируются очаги иммунного воспаления с Т-клеточной и макрофагальной инфильтрацией, а также с присутствием разнообразных медиаторов [2]. Иммунопатогенез РС ассоциируется с одновременным увеличением системной и локальной продукции провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли α (ФНО α) и γ -интерферона (γ ИФН), продуцируемых клеточной субпопуляцией Т-лимфоцитов Т-хелперами 1 типа (Тх1), и ИЛ-17, ИЛ-6, ИЛ-23, секретируемые Т-хелперами 17 типа (Тх17), наряду со снижением числа и активности регуляторных клеток, а также синтезируемых ИЛ-10 и трансформирующего росткового фактора β (ТРФ β) противовоспалительного действия [3, 4, 15]. Уровень последних может повышаться в период ремиссии заболевания, в то время как провоспалительные цитокины доминируют во время развития рецидивов [5]. Несмотря на то, что аномальная продукция цитокинов не является специфичной для РС, тем не менее, коррелирует с прогрессией заболевания, количеством рецидивов и уровень цитокинов активно используется для характеристики воспалительного процесса [2, 6]. В связи с этим цитокиновый профиль при РС является одним из потенциальных кандидатов в качестве диагностического биомаркера при мониторинге течения и эффективности лечения заболевания.

Среди современных подходов специфической терапии РС особое место занимает применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК), положительный эффект которых продемонстрирован на экспериментальных моделях [7, 8]. С одной стороны, МСК обеспечивают защиту тканей ЦНС посредством стимуляции эндогенных механизмов репарации и замещения поврежденных нервных клеток путем трансдифференцировки в нейроны и олигодендроциты, а с другой стороны, способны предотвращать иммуноопосредованное повреждение за счет способности модулировать абберантный ответ к компонентам белка миелина [8, 9]. Наряду с модулирующим влиянием на Т-, В-лимфоциты, натуральные киллеры, дендритные клетки и макрофаги, МСК способны ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитами и повышать экспрессию ИЛ-10 и ИЛ-4 в регуля-

торных клетках. Кроме того, показано, что МСК непосредственно секретируют широкий спектр субстанций, обеспечивающих трофическое питание поврежденной нервной ткани, в том числе и противовоспалительные цитокины ИЛ-10 и ТРФ β , способные индуцировать экспрессию протективного фенотипа иммунных клеток и запускать процессы ремиелинизации [8, 10].

В связи с этим, цитокины выбраны нами в качестве одного из лабораторных параметров оценки иммуномодулирующего эффекта клеточной терапии у пациентов с подтвержденным диагнозом «рецидивно-ремиттирующий рассеянный склероз». На модели *in vitro* совместного культивирования лимфоцитов с МСК в условиях специфической миелиновой и неспецифической митогенной стимуляции, а также в сыворотке пациентов изучена динамика продукции γ ИФН, ФНО α , ИЛ-10 и ТРФ β до и после аутологичной трансплантации МСК. Принимая во внимание, что корректная оценка цитокиновых эффектов *in vivo* является довольно сложным процессом в связи с их коротким периодом полураспада, высокой биологической активностью в низких концентрациях, влиянием микроокружения и т.д., основное внимание в данном исследовании уделено анализу *in vitro* продукции цитокинов в ко-культурах пациентов с РС в динамике посттрансплантационного периода.

Материалы и методы исследования

Периферическая венозная кровь и костный мозг получены от 7 пациентов с рецидивно-ремиттирующим течением РС, которым выполнена трансплантация аутологичных МСК путем внутривенного введения в количестве 93,4 (62,0÷119,0) млн клеток на кг веса на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска. Средний возраст пациентов составил 33,5 (от 18 до 40) лет, средний уровень инвалидизации по шкале EDSS – 2,5 (2,0÷3,0) баллов. Пациенты не получали иммуносупрессивного или модулирующего течение заболевания лечения в течение 6 месяцев до проведения клеточной терапии и включались в клиническое исследование при условии наличия информированного письменного согласия. У всех пациентов отмечалось отсутствие обострений в посттрансплантационном периоде. Забор периферической крови осуществлялся до трансплантации, а также на 10-й день, 1-й, 3-й, 6-й и 9-й месяц после инфузии МСК.

Мононуклеары периферической крови (МПК) и пунктата костного мозга выделяли центрифугированием в течение 30 мин при 1500 об/мин при 4°C на градиенте плотности Histopaque-1077

(«Sigma», Германия) с последующей 2-кратным отмыванием в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, «Gibco», США). МСК ранних пассажей получали из мононуклеаров костного мозга путем культивирования в питательной среде DMEM («Gibco», США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «HyClone», США), 2 mM L-глутамина («Gibco», США), 1% антибиотика-антимикотика («Gibco», США), **при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂** с заменой среды каждые 3-4 дня и последующим пассированием клеточных культур. При достижении 70-80% конfluenceности МСК снимали с поверхности культурального пластика трипсином («Sigma», Германия), после чего активность фермента ингибировалась добавлением среды DMEM с 10% ЭТС [11].

МПК культивировали в концентрации 2×10^5 клеток/лунку 96-луночного круглодонного планшета в полной культуральной среде на основе RPMI-1640 («Invitrogen», Великобритания), с добавлением 10% (ЭТС), 2 mM L-глутамина, 1% антибиотика-антимикотика, в течение 6 дней (при митогенной стимуляции) и 10 дней (при миелиновой стимуляции) при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. В качестве митогена использовали фитогеммагглютинин (ФГА, «Sigma», Германия) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл; в качестве миелинового антигена – рекомбинантный миелин-олигодендроцитарный гликопротеин с аминокислотной последовательностью 1-125 (pMOG РНПЦ ТиМБ, Беларусь) в конечной концентрации 10 мкг/мл. При совместном культивировании МПК и МСК использовали соотношение клеточных культур 10:1. На 6-ой день культивирования осуществляли замену половины культуральной среды с добавлением ИЛ-2 («R&D Systems», США) **в конечной концентрации 10 U/мл.**

Концентрации цитокинов определяли в супернатантах митоген-/миелин стимулированных культур МПК в присутствии или отсутствии МСК и в сыворотке методом иммуноферментного анализа. Для измерения концентрации γ ИФН, ФНО α и ИЛ-10 использовали коммерческие наборы γ ИФН-ИФА-БЕСТ (область определения: 0 – 1000 пг/мл), ФНО α -ИФА-БЕСТ (область определения: 0 – 1000 пг/мл) и ИЛ-10-ИФА-БЕСТ (область определения: 0 – 500 пг/мл) («Вектор БЕСТ», Россия). Для измерения концентрации ТРФ β использовали коммерческий набор КАС1688 («Invitrogen», Канада). Все этапы исследования осуществляли в соответствии с инструкциями фирм изготовителей. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на

спектрофотометре BRIO-SIRIO («SEAC», Италия) при $\lambda=450$ нм и $\lambda=620-650$ нм.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета Statistica 6.0. Полученные данные представлены в медианах с 25% и 75% процентилями. Определение достоверности различий осуществляли непараметрическим критерием Вилкоксона для зависимых переменных. Проверка на нормальность распределения выполнялась с использованием критерия Холмогорова-Смирнова. Корреляционный анализ проводили путем определения коэффициентов корреляции по Спирмену. Во всех случаях результаты принимали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$.

Результаты

Продукция цитокинов in vitro в ко-культурах МПК и МСК в условиях митогенной-/антигенной стимуляции у пациентов с РС до клеточной терапии

Для предварительной оценки in vitro иммуномодулирующего эффекта МСК у пациентов с РС изучена продукция патогенетически значимых провоспалительных цитокинов γ ИФН и ФНО α , а также противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ТРФ β в супернатантах pMOG- и ФГА-стимулированных культурах МПК в присутствии и отсутствие аутологических МСК. Установлено, что при культивировании со специфическим миелиновым антигеном pMOG в культурах МПК не наблюдалось достоверных изменений в продукции цитокинов, в то время как концентрация всех изучаемых цитокинов в клеточных супернатантах при неспецифической стимуляции митогеном, за исключением ИЛ-10, достоверно увеличивалась (Табл. 1).

При добавлении МСК отмечалось выраженное снижение концентрации γ ИФН в миелин-индуцированных ко-культурах ($p < 0,01$) наряду с тенденцией к уменьшению продукции цитокина в супернатантах ФГА-стимулированных ко-культур МПК и МСК ($p = 0,06$) (Табл. 1). Продукцию ФНО α МСК достоверно ингибировали как при специфической, так и неспецифической стимуляции МПК. При этом в условиях культивирования с потенциальным миелиновым аутоантигеном продукция γ ИФН и ФНО α в ко-культурах МПК и МСК снижалась также по отношению и к спонтанному синтезу цитокинов на 33,0% и 41,9%, соответственно. Характер продукции противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ТРФ β в присутствии МСК имел обратную тенденцию. Концентрация ИЛ-10 незначительно

Таблица 1. Концентрация цитокинов в супернатантах клеточных культур при различных условиях культивирования (медиана, 25÷75-й процентиля), пг/мл

	Неспецифическая стимуляция			Специфическая стимуляция			p
	спонтанная	ФГА	ФГА+МСК	спонтанная	pМОГ	pМОГ+МСК	
	1	2	3	4	5	6	
γИФН	38,0 (27,8÷928,9)	581,4 (293,6÷2760,1)	113,1 (90,4÷1790,0)	102,7 (68,2÷1742,8)	310,8 (99,7÷1957,1)	68,8 (26,4÷543,4)	$p_{1-2}=0,04$ $p_{2-3}=0,06$ $p_{5-6}=0,01$ $p_{4-6}=0,06$
ФНОα	48,8 (38,5÷461,6)	603,1 (554,7÷921,5)	325,1 (217,3÷459,7)	167,1 (103,8÷450,2)	178,8 (136,8÷524,4)	70,1 (53,0÷168,6)	$p_{1-2}=0,04$ $p_{2-3}=0,04$ $p_{5-6}=0,04$ $p_{4-6}=0,04$
ИЛ-10	259,1 (139,3÷379,0)	393,2 (113,1÷673,3)	479,3 (170,7÷788,0)	185,6 (142,6÷228,6)	165,2 (153,6÷176,8)	254,0 (224,8÷283,3)	$p_{2-3}=0,06$ $p_{1-3}=0,06$ $p_{5-6}=0,06$
ТРФβ	247,0 (192,0÷279,0)	369,5 (239,0÷404,0)	376,0 (348,0÷398,0)	271,0 (155,0÷296,0)	212,5 (161,0÷288,0)	301,0 (276,0÷350,0)	$p_{1-2}=0,02$ $p_{1-3}=0,02$ $p_{5-6}=0,04$

Примечание: p – уровень значимости, определяемый критерием Вилкоксона; спонтанная – продукция цитокинов МПК без стимуляции; ФГА – продукция цитокинов МПК при стимуляции митогеном ФГА; ФГА+МСК – продукция цитокинов МПК при стимуляции митогеном ФГА в присутствии МСК; pМОГ – продукция цитокинов МПК при стимуляции антигеном pМОГ; pМОГ+МСК – продукция цитокинов МПК при стимуляции антигеном pМОГ в присутствии МСК.

увеличивалась в миелин-/митоген-индуцированных ко-культурах по отношению как к стимулированной (53,8% / 21,9%, соответственно), так и к спонтанной продукции (36,8% / 85,0% соответственно) ($p=0,06$). В то же время, совместное культивирование с МСК приводило к достоверному повышению ТРФβ как миелин-, так и митоген-стимулированными мононуклеарами (Табл. 1).

Таким образом, у пациентов с РС иммуномодулирующий эффект МСК характеризуется супрессией *in vitro* продукции провоспалительных цитокинов с тенденцией к активации синтеза цитокинов регуляторного профиля.

In vitro продукция цитокинов у пациентов с РС после клеточной терапии

Аналогичный подход к анализу продукции цитокинов культурами лимфоцитов был использован у пациентов с РС после трансплантации аутологичных МСК. Полученные результаты представлены в виде концентраций цитокинов в клеточных супернатантах миелин-/митоген-стимулированных МПК в динамике до 9 месяцев посттрансплантационного периода (Рис. 1).

Динамика продукции γИФН, ФНОα и ИЛ-10 миелин-стимулированными клеточными культурами у пациентов с РС имела одинаковую направленность. На 10-е сутки после клеточной терапии отмечалась тенденция к

увеличению концентрации γИФН, ФНОα и ИЛ-10 в среднем в 1,7 – 2,1 раза с последующим снижением уровня синтезируемых цитокинов к 3-му – 6-му месяцам посттрансплантационного периода (Рис. 1). Миелин-индуцированная продукция γИФН к 3-му месяцу у пациентов с РС ассоциировалась с количеством трансплантированных МСК ($R=-0,82$; $p=0,04$). При этом значения концентрации провоспалительных цитокинов к вышеуказанным срокам наблюдения после клеточной терапии были сопоставимы с таковыми при миелин-специфической стимуляции ко-культур МПК и МСК *in vitro* у пациентов с РС до трансплантации: (γИФН: 121 пг/мл и 68,8 пг/мл; ФНОα: 45,9 пг/мл и 70,1 пг/мл, соответственно) (Рис. 1, Табл. 1). Концентрация ТРФβ в супернатантах миелин-стимулированных клеточных культурах достоверно не изменялась на протяжении всего периода наблюдения (Рис. 1).

Общепринятым считается, что оценка *in vitro* продукции цитокинов в условиях неспецифической стимуляции митогенами является одним из показателей, характеризующих общее состояние иммунной системы, включающее противoinфекционную, противоопухолевую защиту организма и т.д. [12]. Исходя из этого, проведен сравнительный анализ влияния МСК на митоген-индуцированный синтез цитокинов у пациентов с РС после клеточной терапии.

У пациентов с РС после аутологичной трансплантации МСК не отмечалось выраженных

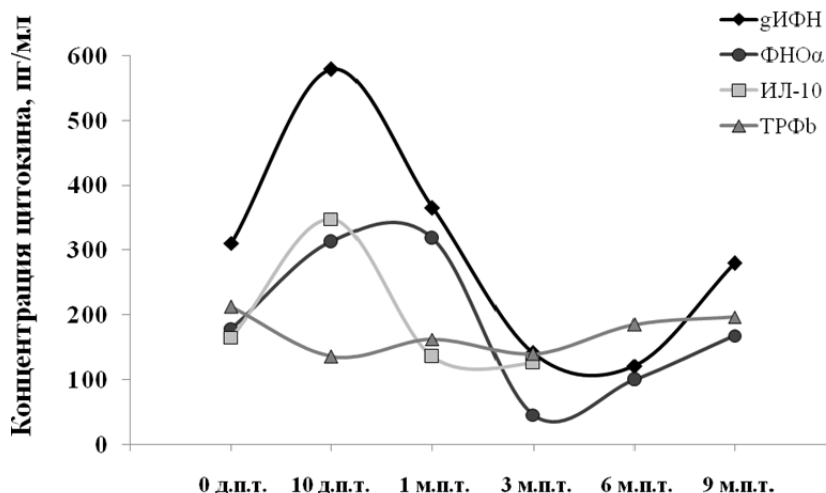


Рис. 1. Концентрация γ ИФН, ФНО α , ИЛ-10 и ТРФ β в супернатантах миелин-стимулированных культур МПК до и после трансплантации МСК у пациентов с РС, пг/мл

Примечание: д.п.т. – дней после трансплантации, м.п.т. – месяцев после трансплантации

изменений в продукции ФНО α и ТРФ β ФГА-стимулированными МПК на протяжении всего периода мониторинга. В то же время, на 10-й день после трансплантации выявлена тенденция к повышению митоген-индуцированного синтеза γ ИФН и ИЛ-10 с последующим снижением концентрации цитокинов, соответственно, к 9-му и 1-му месяцу (Рис. 2). При этом, к 9-му месяцу после инфузии МСК митоген-стимулированная продукция γ ИФН снижалась в 86% случаев, возвращаясь к уровню неспецифического синтеза цитокина до трансплантации.

Таким образом, клеточная терапия приводит к кратковременному повышению провоспалительных цитокинов миелин-стимулированными лимфоцитами пациентов с РС на 10-й день после трансплантации с последующим ингибированием продукции ФНО α и γ ИФН на протяжении 3-6 месяцев посттрансплантационного периода. При этом, не наблюдалось выраженного супрессивного влияния по отношению к продукции провоспалительных цитокинов в условиях неспецифической стимуляции у пациентов с РС в течение всего периода наблюдения.

Влияние клеточной терапии на продукцию ТРФ β в сыворотке крови

Учитывая отсутствие динамики изменения концентрации ТРФ β в супернатантах миелин-стимулированных клеточных ко-культур МПК и

МСК, а также в культурах МПК после терапии у пациентов с РС и принимая во внимание многочисленные публикации о двойственности про- или противовоспалительного действия ТРФ β [6, 13, 14], проведен анализ концентрации изучаемого цитокина в сыворотке крови до и в течение 9 месяцев после клеточной терапии. В отличие от γ ИФН, ФНО α и ИЛ-10, которые не детектировались в сыворотке крови, концентрация ТРФ β у всех пациентов как до, так и после клеточной терапии была на порядок выше по сравнению с таковой *in vitro* (Табл. 1, 2). Высокий уровень продукции ТРФ β *in vivo* обеспечивается наличием широкого спектра клеточных источников, среди которых – моноциты/макрофаги, фибробласты, эндотелиоциты, тучные клетки, гладко-мышечные клетки, лимфоциты и др., что в свою очередь может затруднить определение удельного веса МСК в модулировании продукции ТРФ β после терапии [13].

В результате проведенных исследований установлено, что концентрация ТРФ β в сыворотке крови пациентов с РС не изменялась на протяжении всего посттрансплантационного периода (Табл. 2). Следует отметить, что при индивидуальном анализе у 50% пациентов с РС наблюдалось резкое увеличение концентрации ТРФ β к 6-му – 9-му месяцам клеточной терапии (пациенты с положительной динамикой), в то время как у 50% регистрировалось снижение ТРФ β к 6-ти

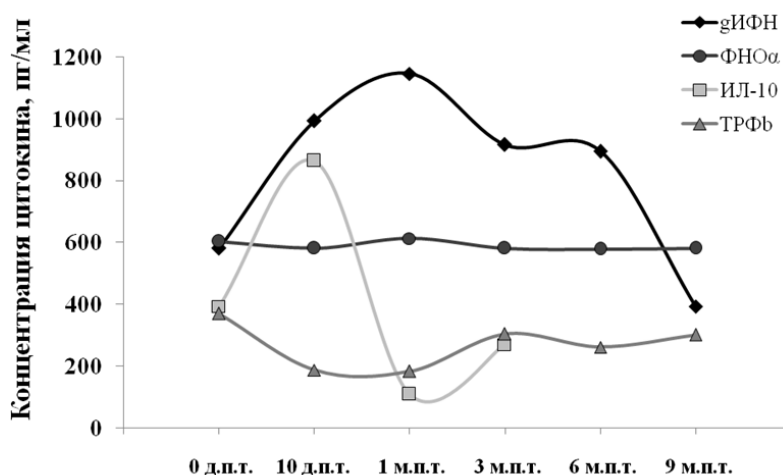


Рисунок 2. Концентрация γ ИФН, ФНО α , ИЛ-10 и ТРФ β в супернатантах митоген-стимулированных культур МПК до и после трансплантации МСК у пациентов с РС, пг/мл

Примечание: д.п.т. – дней после трансплантации, м.п.т. – месяцев после трансплантации

Таблица 2. Концентрация ТРФ β в сыворотке пациентов с РС до и после клеточной терапии, пг/мл

Период наблюдения					
0 д.п.т.	10 д.п.т.	1 м.п.т.	3 м.п.т.	6 м.п.т.	9 м.п.т.
6919,0	7654,0	4417,0	4852,5	5375,0	5351,0
(2578,0÷15189,0)	(2908,0÷10833,0)	(2573,5÷7265,0)	(2494,0÷25158,5)	(3170,0÷24686,0)	(4128,0÷6610,0)

Примечание: д.п.т. – дней после трансплантации, м.п.т. – месяцев после трансплантации

месяцам после трансплантации МСК (пациенты с отрицательной динамикой) (Рис. 3).

Таким образом, принимая во внимание особенности синтеза ТРФ β многочисленными клеточными источниками и плеiotропность эффектов, вопрос о корректности интерпретации полученных результатов и определения иммуномодулирующего эффекта МСК по отношению к *in vivo* продукции изучаемого цитокина остается дискуссионным.

Обсуждение

Патогенез РС представляет собой сложный мультифакториальный аутоиммунный процесс, приводящий к развитию иммунного воспаления, демиелинизации, повреждению аксонов, дегенерации нейронов и глиоза белого и серого вещества. Среди широкого спектра молекул врожденного и приобретенного иммунитета цитокины играют ключевую роль в инициации и развитии РС. Существует множество путей,

посредством которых цитокины вовлекаются в патогенез РС: модулирование функции антиген-презентирующих клеток (АПК) за счет повышения экспрессии МНС II класса для оптимальной презентации антигена CD4⁺T-клеткам; активация экспрессии костимулирующих молекул на АПК, необходимых для полной активации T-лимфоцитов и т.д. В свою очередь АПК высвобождают цитокины, индуцирующие дифференцировку наивных CD4⁺T-клеток в эффекторные или регуляторные субпопуляции T-лимфоцитов. Цитокины участвуют в миграции T-клеток в ЦНС, где также могут влиять на проницаемость гемато-энцефалического барьера, дифференцировку предшественников олигодендроцитов, активацию микроглии и астроцитов, таким образом, участвуя в прогрессировании заболевания или ремиелинизации [15].

При *in vitro* оценке продукции цитокинов МПК пациентов с РС до аутологичной трансплантации МСК установлено достоверное уве-

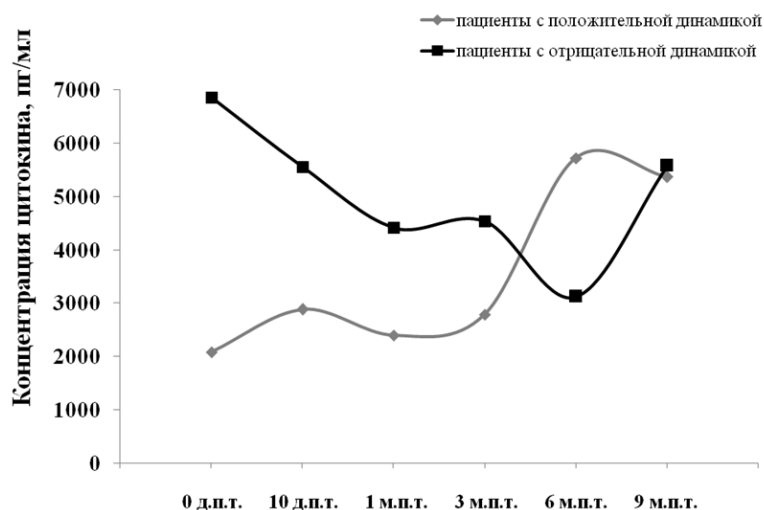


Рисунок 3. Концентрация ТРФβ в сыворотке пациентов с РС с положительной и отрицательной динамикой до и после клеточной терапии, пг/мл

Примечание: д.п.т. – дней после трансплантации, м.п.т. – месяцев после трансплантации

личение концентрации провоспалительных цитокинов γИФН и ФНОα в условиях митогенной стимуляции, что характеризует функциональную состоятельность МПК при РС. При миелин-специфической стимуляции отмечалось также достоверное увеличение синтеза γИФН и тенденция к повышению уровня ФНОα у пациентов с РС, что подтверждает роль данных цитокинов в патогенезе заболевания. РС рассматривается как Th1/Th17-медирированное аутоиммунное заболевание, при котором изначальная активация Th1-клеток характеризуется вовлечением индукции ИЛ-12, экспрессией транскрипционных факторов STAT4 (signal transducer and activator of transcription) и T-box (экспрессируется в T-bet), и последующей повышенной продукцией провоспалительных цитокинов γИФН и ФНОα. Последние, наряду с ИЛ-1β и ИЛ-12, способны инициировать или усиливать образование бляшек [1, 15].

γИФН синтезируется активированными CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитами, включая миелин-специфические Т-лимфоциты, натуральными киллерами (НК- и НКТ-клетки) и профессиональными АПК. Среди основных биологических эффектов γИФН, которые играют важную роль в развитии воспаления в ЦНС при РС, выделяют активацию макрофагов, продукцию оксида азота из аргинина, повышение экспрессии молекул МНС I класса, индукцию антигенов МНС II класса и Т-клеточный хоуминг. Однако, многочисленные исследования лечения экспериментального ауто-

иммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) с помощью анти-γИФН антител и мышей с нарушенной экспрессией гена γИФН демонстрируют более тяжелое течение ЭАЭ. Кроме того лечение рекомбинантным γИФН по разным данным может как ослабевать заболевание, так и значительно усугублять его развитие [4, 15, 16]. Ключевые провоспалительные эффекты еще одного цитокина, доминирующего при РС, – ФНОα – приводят к нарушению проницаемости гемато-энцефалического барьера, демиелинизации и повреждению олигодендроцитов [17, 18].

Наряду с установленным повышением продукции *in vitro* провоспалительных цитокинов, у пациентов с РС до аутологичной трансплантации МСК было также продемонстрировано увеличение уровня синтеза в ответ на неспецифическую митогенную стимуляцию регуляторных цитокинов ИЛ-10 и ТРФβ. Данные результаты могут свидетельствовать о возможной активации собственных репаративных механизмов организма в ходе развития патологического процесса. Однако, принимая во внимание отсутствие достоверных изменений в продукции регуляторных цитокинов в условиях миелин-специфической стимуляции у пациентов с РС, можно заключить, что действие эндогенной репарации не является достаточным для предотвращения аутоиммунной агрессии.

ИЛ-10 представляет собой мощный противовоспалительный гомодимерный цитокин, который при связывании со своим гетероди-

мерный рецептором способен супрессировать экспрессию воспалительных цитокинов, адгезивных молекул и протеинов, необходимых для антигенной презентации [19, 20]. ТРФβ является секреторным гомодимерным цитокином, контролирующим рост и дифференцировку клеток. Роль ТРФβ при ЭАЭ противоречивая в связи с возможностью дифференцировки наивных клеток как в Th17-лимфоциты, так и в регуляторные Т-клетки (Treg). В присутствии ИЛ-6 в процессе антигенной презентации ТРФβ может индуцировать ИЛ-17-продуцирующие Т-лимфоциты *in vitro*. Однако, исследования показывают, что эта популяция не является патогенной при ЭАЭ, в то время как ИЛ-23-индуцированные Th17 способствуют развитию заболевания. Пластичность дифференцировки Т-лимфоцитов под действием ТРФβ до сих пор изучается. Роль ТРФβ как эффекторного цитокина Treg менее противоречива: регуляторные клетки не только продуцируют ТРФβ для поддержания self-толерантности, но и для выживания естественных Treg. ТРФβ супрессирует дифференцировку Th1, иницируя T-bet и STAT4 экспрессию [13, 14, 21].

Начиная с 1990-х гг. для терапии РС используются лекарственные препараты, модифицирующие развитие заболевания, в том числе ингибиторы провоспалительных цитокинов и активаторы регуляторных молекул. Однако эффективность данных препаратов остается спорной в связи с плейотропностью цитокиновых эффектов и, как следствие, множеством побочных эффектов. Например, применение в качестве терапевтических агентов регуляторных цитокинов ИЛ-10 и ТРФβ, которые иммунная система использует для контроля локального воспаления, затруднительно в связи с созданием нежелательного дисбаланса в иммунной системе, высокой вероятностью развития опухолевых заболеваний (в случае ИЛ-10) или нежелательной индукцией Th17-клеток (в случае ТРФβ) [6].

В данной статье рассмотрено влияние клеточной терапии на *in vitro* синтез провоспалительных (γИФН, ФНОα) и противовоспалительных (ИЛ-10 и ТРФβ) цитокинов, баланс которых определяет развитие нейроиммунного воспаления как на периферии, так и в ЦНС. Продемонстрировано, что до клеточной трансплантации у пациентов с РС МСК снижают продукцию патогенетически значимых γИФН и ФНОα как миелин-, так и митоген-стимулированными МПК. Наряду с этим в присутствии МСК наблюдалось достоверное увеличение продукции регуляторных ИЛ-10 и ТРФβ миелин-индуцированными МПК. Таким

образом, МСК способны переключать профиль цитокинового синтеза с провоспалительного на регуляторный в условиях миелиновой стимуляции МПК у пациентов с РС.

После аутологичной трансплантации МСК у пациентов с РС на 10-й день регистрировалось кратковременное повышение способности миелин-стимулированных МПК синтезировать γИФН, уровень которого достоверно уменьшался к 6-ти месяцам после клеточной терапии. Кратковременное повышение γИФН может представлять собой механизм защиты МСК от потенциального лизиса натуральными киллерами, а также обеспечивать праймирование МСК. Аналогичная супрессия миелин-индуцированного синтеза ФНОα наблюдалась у пациентов с РС к 3-му месяцу после инфузии МСК. При этом к указанным срокам концентрация провоспалительных цитокинов снижалась до уровня, сопоставимого с миелин-специфическим синтезом γИФН и ФНОα МПК в присутствии МСК *in vitro*. Наряду с этим, достоверные изменения в динамике митоген-индуцированного синтеза провоспалительных цитокинов в период после клеточной терапии отсутствовали.

Иммунная функция МСК представляет собой баланс между активацией и супрессией [22, 23]. При этом функциональная пластичность МСК определяется микроокружением, в котором они постоянно находятся или в которое они мигрируют. Подобно эффекторным клеткам иммунной системы для МСК необходим активационный сигнал от провоспалительных цитокинов, чтобы реализовать свой противовоспалительный потенциал. Активированные воспалительным микроокружением МСК продуцируют иммуномодулирующие факторы (hepatocyte growth factor (HGF), heme oxygenase 1 (HO-1), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), ИЛ-10, prostaglandin E2 (PGE2), TGFβ), которые ингибируют созревание и развитие АПК, супрессируют Т-клеточную активацию и функциональный потенциал и индуцируют регуляторные дендритные клетки и регуляторный Т-клеточный фенотип [24]. При этом механизмы цитокин-индуцированной МСК-опосредованной иммуносупрессии могут быть различными. Например, Chan и соавт. показали, что уровень эндогенного γИФН изменяет функцию человеческих МСК костного мозга с антиген-презентирующей на аллоингибиторную [25]. Низкие концентрации γИФН повышают экспрессию молекул МНС II класса на МСК и способствуют их функционированию в качестве АПК, в то время как высокие концентрации

γИФН снижают экспрессию молекул МНС II класса и переключают свойства МСК на иммуносупрессивные. Аллоингибиторные свойства МСК, индуцированные γИФН, опосредованы IDO [26, 27]. Крампрега и соавт. установили, что МСК костного мозга, стимулированные экзогенным γИФН способны ингибировать натуральные киллеры и Т-лимфоциты посредством продукции IDO [28, 29]. ФНОα и γИФН способствуют продукции МСК PGE2, TRFβ1 и HO-1, которые индуцируют CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторные Т-клетки из наивных Т-лимфоцитов *in vitro* [30, 31].

Известно, что после введения клеточного трансплантата пациентам МСК способны мигрировать в различные органы и ткани, преимущественно в область воспаления. Посредством экспрессии различных молекул toll-like receptors (TLR2, TLR3, TLR4) МСК могут специализированно взаимодействовать и отвечать на медиаторы воспалительного микроокружения, в том числе γИФН и ФНОα. При этом связывание лигандов с TLR влияет на дифференцировку, пролиферацию, миграцию и иммуномодулирующие свойства МСК. В свою очередь Waterman и соав. предложили, что лигирование TLR определяет профиль МСК: провоспалительный (МСК 1 типа) или иммуносупрессивный (МСК 2 типа). Так, МСК 1 типа, праймированные через TLR4,

синтезируют ИЛ-6, ИЛ-8 и TRFβ1/3, в то время как МСК 2 типа, праймированные через TLR3, продуцируют PGE2 и IDO, однако у них снижена продукция TRFβ1/3 [32].

Выводы

У пациентов с РС МСК достоверно снижают *in vitro* миелин-специфическую продукцию провоспалительных цитокинов, как Т-хелперного звена (γИФН), так и моноцит-макрофагальной системы (ФНОα) наряду со статистически значимым увеличением синтеза регуляторных цитокинов ИЛ-10 и TRFβ.

После клеточной терапии иммуномодулирующий эффект МСК проявляется в виде кратковременного повышения концентрации миелин-индуцированных γИФН, ФНОα и ИЛ-10 на 10-й день посттрансплантационного периода и последующего снижения уровня синтеза γИФН и ФНОα к 3-му – 6-му месяцам до уровней, сопоставимых с таковыми в условиях *in vitro* антиген-специфической стимуляции ко-культур лимфоцитов и МСК.

Оценка продукции цитокинов на модели *in vitro* совместного культивирования клеток, как со специфическим миелиновым антигеном, так и неспецифическим митогеном, является наиболее адекватной моделью для изучения механизмов иммуномодулирующего действия МСК при РС.

Литература

1. Romme-Christensen J, Bornsen L, Hesse D. et al. Cellular sources of dysregulated cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 215-26.
2. Ortiz G., Pacheco-Moises F, Bitzer-Quintero O. et al. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 708659-73.
3. Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res*. 1996; 45(4): 322-33.
4. Martins T., Rose J., Jaskowski T. et al. Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *Am J Clin Pathol*. 2011; 136(5): 696-704.
5. Imam S., Guyton M., Haque A. Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *J Neuroimmunol*. 2007; 190: 139-145.
6. Amedei A., Prisco D. and Milco D'Elios M. Multiple sclerosis: the role of cytokines in pathogenesis and in therapies. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(10): 13438-60.
7. Auletta J., Cooke K., Solchaga L., Deans R., van't Hof W. Regenerative stromal cell therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: current impact and future directions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010; 16(7): 891-906.
8. Jumah M. and Abumaree M. The immunomodulatory and neuroprotective effects of mesenchymal stem cells (MSCs) in

- experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): a model of multiple sclerosis (MS). *Int J Mol Sci*. 2012; 13(7): 9298-331.
9. Witherick J., Wilkins A., Scolding N. and Kemp K. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and s cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis*. 2010; 2011: 164608-19.
10. Aggarwal S., Pittenger M. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 105: 1815-1822.
11. Zafranskaya M., Nizheharodava D., Yurkevich M. et al. In vitro assessment of mesenchymal stem cells immunosuppressive potential in multiple sclerosis patients. *Immunol Lett*. 2013; 149(1-2): 9-18.
12. Wimer B. Characteristics of PHA-L4, the mitogenic isolectin of phytohemagglutinin, as an ideal biologic response modifier. *Mol Biother*. 1990; 2(1): 4-17.
13. Li M., Wan Y., Sanjabi S., Robertson A-K., Flavell R. Transforming growth factor-β regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 99-146.
14. Lin J., Martin S., Xia L., Gorham J. TGF-beta I uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4⁺ T cells at priming and recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. *J Immunol*. 2005; 174(10): 5950-8.
15. Rodgers J. and Miller S. Cytokine control of inflammation and repair in the pathology of multiple sclerosis. *Yale J Biol Med*. 2012; 85(4): 447-68.

16. Miller E. Multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 724: 222-38.
17. McCoy M., Tansey M. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation.* 2008; 5: 45.
18. Caminero A., Comabella M., Montalban X. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: an ongoing story. *J Neuroimmunol.* 2011; 234(1-2): 1-6.
19. Adikari S., Pettersson A., Soderstrom M., Huang Y-M., Link H. Interleukin-10-modulated immature dendritic cells control the proinflammatory environment in multiple sclerosis. *Scand J Immunol.* 2004; 59(6): 600-6.
20. Moor K., de Waal Malefyt R., Coffman R., O'Garra F. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:683-765.
21. Gutcher I., Donkor M., Ma Q., Rudensky A., Flavell R., Li M. Autocrine transforming growth factor-beta 1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity.* 2011; 34(3): 396-408.
22. Darlington P., Boivin M-N., Bar-Or A. Harnessing the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2011; 11(9): 1295-1303.
23. Fang L., Lange C., Engel M., Zander A., Fehse B. Sensitive balance of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on T-cell proliferation. *Transplantation.* 2006; 82: 1370-1373.
24. Auletta J., Bartholomew A., Maziarz R. et al. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Immunotherapy.* 2012; 4(5): 529-547.
25. Chan J., Tang K., Patel A. et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood.* 2006; 107(12): 4817-4824.
26. Krampera M., Cosmi L., Angeli R. et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells.* 2006; 24: 386-398.
27. Ryan J., Barry F., Murphy J., Mahon B. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149: 353-363.
28. Auletta J., Deans R., Bartholomew A. Emerging roles for multipotent, bone-marrow-derived stromal cells in host defense. *Blood.* 2012; 119(8): 1801-1809.
29. Zafranskaya M., Nizheharodava D., Yurkevich M. et al. PGE2 contributes to in vitro MSC-mediated inhibition of non-specific and antigen-specific T cells proliferation in MS patients. *Scan J Immunol.* 2013; 78: 455-462.
30. English K., Ryan J., Tobin L., Murphy M., Barry F., Mahon B. 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. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156(1): 149-160.
31. Chabannes D., Hill M., Merieau E. et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood.* 2007; 110(10): 3691-3694.
32. Waterman R., Tomchuck S., Henkle S., Betancourt A. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* 2010; 5(4): e10088.

Сведения об авторе:

Зафранская Марина Михайловна. 220013, г. Минск, ул. П.Бровки, 3/3. E-mail: zafranskaya@gmail.com. Тел.: + 375 17 2653356 (раб.), +375 29 6312548 (моб.)

Поступила 15.08.2014 г.