

Фибробласты в качестве иммуносупрессоров – функциональный эквивалент мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

К настоящему времени в нескольких независимых лабораториях были продемонстрированы иммуномодулирующие эффекты мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) *in vitro*, такие как супрессия пролиферации аллогенных Т-лимфоцитов [1], индукция энергии и апоптоза Т-клеток [2], модуляция продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками [3] и ингибирование созревания дендритных клеток (ДК) [4]. Эта иммуномодуляция антиген-неспецифична и осуществляется через взаимодействия типа «клетка-клетка», а также опосредована рядом растворимых факторов, таких как TGF- β , PGE2 и метаболиты триптофана [5, 6]. Результаты ранних фаз клинических испытаний свидетельствуют о том, что внутривенное введение ММСК, изолированных из костного мозга и культивированных *in vitro*, препятствует развитию у пациентов, перенесших трансплантацию ГСК, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [7].

В 2007 году в *Journal of Immunology* была опубликована статья группы Collin M.P. et al. В своей работе исследователи сравнили иммунологические характеристики фибробластов кожи человека и ММСК костного мозга. В отличие от предыдущих работ исследование выполнено не на коммерческих линиях фибробластов с измененными свойствами, а на первичной культуре.

Дермальные фибробласты были получены из биоптатов кожи. Их изолировали на основе адгезии к пластику и определения иммунофенотипа CD73⁺CD45⁻. ММСК получали из мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга и проверяли их способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. Дендритные клетки (ДК) для исследования получали из CD14⁺ моноцитов крови, изолированных с помощью магнитного сортирования. Клетки культивировали в течение 6 дней, после чего проводили их активацию LPS и TNF- α . Также в качестве контрольных АПК были получены клетки Лангерганса, изолированные из фрагментов кожи путём их спонтанной миграции из ткани.

В исследовании был определён характер взаимодействия фибробластов и ММСК с аллогенными иммунокомпетентными клетками при обычном сокультивировании в реакции смешанной культуры лимфоцитов (РСКЛ), когда фибробласты и ММСК добавляли в культуры CD3⁺ Т-лимфоцитов и аллогенных ДК.

Было обнаружено, что дермальные фибробласты 1–6 пассажей способны подавлять иммунный ответ Т-лимфоцитов на аллогенные ДК при соотношениях, аналогичных для ММСК. При этом используемые фибробласты были аллогенны как Т-клеткам, так и ДК. Также было показано, что фибробласты первичных культур супрессируют ответ Т-лимфоцитов на аллогенные клетки Лангерганса и ДК в случае аутогенного происхождения ДК и фибробластов. Таким образом, становится ясно, что иммуносупрессивный потенциал присущ всем без исключения дермальным фибробластам, а не только их отдельным субпопуляциям, получаемым в результате культивирования *in vitro*.

Фибробласты ингибировали пролиферацию аллогенных Т-клеток, активированных с помощью ДК, даже если клеточные популяции были разделены полупроницаемой мембраной. Однако в этом случае эффект был выражен в меньшей

степени. Этот результат указывает на то, что растворимые факторы опосредуют иммуномодулирующие эффекты фибробластов лишь частично, но непосредственный контакт клеток остаётся одним из важных условий иммуносупрессии. Супернатанты культур фибробластов и смешанных культур также обладали иммуносупрессивными свойствами, которые проявлялись в той же степени, что и при разделении популяций клеток полупроницаемой мембраной. Таким образом, активированные Т-клетки стимулируют продукцию фибробластами ингибирующих сигналов, создавая систему с отрицательной обратной связью.

Исследователи также оценили роль в процессе иммуносупрессии IFN- γ . Оказалось, что блокирование IFN- γ антителами полностью нивелировало иммуносупрессивные эффекты как фибробластов, так и ММСК. Скорее всего, это связано с индукцией интерфероном синтеза простагландинов и усилением метаболизма триптофана через индукцию фермента индоламин-диоксигеназы.

Супрессия активности Т-клеток была обратима. Если Т-клетки, предварительно стимулированные аллогенными ДК в присутствии фибробластов или ММСК, извлекали из культуры, культивировали в течение 4–6 суток, а затем рестимулировали с помощью CD3/CD48, то Т-клетки отвечали мощной пролиферацией.

Известно, что внутривенное введение ММСК пациентам с тяжёлыми формами РТПХ приводит к улучшению их состояния и в некоторых случаях – к полному исчезновению симптомов заболевания. Однако трудно сказать, каким образом этот эффект соотносится с иммунологическими свойствами данных клеток. Исследователи сделали попытку решить эту проблему, смоделировав РТПХ *in vitro* и оценив терапевтическую роль в ней как ММСК, так и фибробластов. В этой модели проводилась стимуляция Т-клеток потенциального «донора» антигенами аллогенного «реципиента» непосредственно во фрагменте кожи «реципиента», после чего можно было наблюдать выраженную гистопатологическую реакцию. В то же время, если Т-клетки сенсibilizировали ДК в присутствии ММСК либо фибробластов, гистопатологическая реакция оказывалась как минимум слабее выражена либо практически отсутствовала. ММСК и фибробласты, использовавшиеся в работе, обладали сходным фенотипом: они экспрессировали на мембране молекулы MHC-I, CD73, CD90, CD105; более 30% фибробластов кожи экспрессировали также CD271, хотя данный маркер считается характерным для ММСК костного мозга и указывает на высокий пролиферативный и дифференцировочный потенциал [7].

Данное исследование показывает, что фибробласты обладают сходными с ММСК иммунологическими свойствами, реализующимися через аналогичные механизмы супрессии активности Т-клеток. Авторы считают, что иммуносупрессивные свойства должны быть присущи всем фибробластоподобным клеткам. По их мнению, это связано с присутствием фибробластов во всех органах организма, в том числе в лимфоидных органах. Результаты данной работы указывают на потенциальную возможность использования аутогенных фибробластов в качестве аналогов ММСК при коррекции РТПХ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 42–8.
2. Glennie S, Soeiro P, Dyson P.J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005; 105(7): 2821–7.
3. Aggarwal S, Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; 105(4): 1815–22.
4. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness.

Blood. 2005; 105: 2214–9.

5. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99: 3838–43.
6. Krampfer M, Cosmi L, Angeli R. et al. Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006; 24: 386–98.
7. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P. et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 783–91.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Haniffa M., Wang X.-N., Holtick U. et al. *Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells. The Journal of Immunology* 2007; 179: 1595–604

Клетки костного мозга мигрируют в места локализаций новообразований и приобретают фенотип опухолевых клеток

В настоящее время получены убедительные доказательства, что стволовые/прогениторные клетки костного мозга взрослых могут мигрировать в удаленно расположенные органы [1, 2]. В нормальных условиях миграция клеток костного мозга, по-видимому, не играет какой-либо существенной функциональной роли, тогда как при некоторых патологических состояниях может иметь большое значение. Ранее было продемонстрировано, что клетки костного мозга мигрируют в очаги повреждений и/или воспаления, что опосредовано градиентами концентраций некоторых ассоциируемых с воспалением хемокинов [3, 4]. Роль, которую играют мигрирующие клетки в очаге воспаления, остается предметом дискуссий. Благодаря секреции цитокинов, дифференцировке в необходимые клеточные типы или клеточному слиянию они могут способствовать репаративной регенерации.

Houghton J. et al. предположили, что мигрирующие в очаги хронического воспаления клетки костного мозга могут предрепевать злокачественную трансформацию и служить источником новообразований. В опубликованной ими работе в журнале *Science* они использовали облученных мышей, которым трансплантировали меченые клетки костного мозга [5]. Позднее, животные инфицировались хеликобактером *Felix*, в результате чего у мышей развивались очаги хронического воспаления в слизистой оболочке желудка, которые прогрессировали до рака. В течение 20 недель после инфицирования меченые клетки костного мозга мигрировали в очаги воспаления в слизистой оболочке желудка. Здесь они дифференцировались и приобретали морфологию эпителиальных клеток, при этом сохраняя маркеры клеток костного мозга. Меченые дифференцированные клетки имели признаки злокачественной трансформации, и, по мнению авторов, служили источником возникновения новообразований. Таким образом, Houghton J. et al. предложили новую модель возникновения злокачественных новообразований в виде трансформации стволовых/прогениторных клеток костного мозга в условиях хронического воспаления. На основании данной модели легко объяснить такие присущие клеткам опухоли свойства, как способность к самообновлению, от-носительная резистентность к апоптозу, способность к метастазированию и ранней диссеминации. Richard Peek из

Vanderbilt University School of Medicine, один из ведущих специалистов по изучению *Helicobacter*, назвал данную гипотезу интересной и перспективной в контексте разработки методов, направленных на профилактику рака желудка [6].

Тем не менее, некоторые ведущие специалисты в области исследований стволовых клеток выразили сомнения относительно данной модели возникновения злокачественных новообразований. В частности, Ирвинг Вейсман подверг критике данную работу, так как в ней не была исключена возможность слияния клеток костного мозга с эпителиальными клетками слизистой оболочки желудка [6]. Используя разные методики (исследование гистологических срезов на предмет наличия двуядерных эпителиальных клеток с метками; FACS анализ окрашенных пропидием разных типов клеток для сравнительной оценки содержания ДНК; FISH-анализ меченых эпителиальных клеток на предмет наличия слившихся клеток с фенотипом ХХУ, ХХХУ), J. Houghton et al. не обнаружили признаков стабильного слияния клеток. Однако, Ирвинг Вейсман указал, что нет никаких оснований отвергать возможность нестабильного слияния клеток с последующим редукционным делением. Более того, слияние клеток костного мозга с клетками эпителия слизистой оболочки желудка может являться одним из механизмов канцерогенеза, аналогично концепции миелоидных гибридных клеток, развиваемой J. Pawelek [7].

В новой работе, опубликованной в журнале *Stem Cells*, C. Cogle et al. получили данные, что часть клеток в составе некоторых опухолей могут иметь костномозговое происхождение. Однако при этом клетки костного мозга не являются источником новообразования. В исследовании не было обнаружено признаков стабильного или нестабильного слияния клеток опухоли и костного мозга. На первом этапе анализировались биоптаты аденом толстой кишки, обнаруженных у двух женщин с признаками РТПХ (диарея), ранее перенесших трансплантацию гемопоэтических клеток от несовместимых доноров-мужчин. Так как аденомы были обнаружены всего лишь через 2 месяца после трансплантации, предполагалось, что они имеют полностью реципиентское происхождение. К удивлению, от 1 до 4% опухолевых клеток несли маркеры клеток костного мозга. Эти эпителиальные клетки