

ЭКСПРЕССИЯ CD106 И КОИНГИБИТОРНЫХ МОЛЕКУЛ CD273, CD274, CD276 НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПЛАЦЕНТЫ

Лях Е. Г., Шитикова М. Г., Исайкина Я. И., Новикова М. А.

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Сравнительные исследования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из различных тканей организма, показали, что наряду с однотипными основными характеристиками клеток наблюдаются отличия в пролиферативном и дифференцировочном потенциале, а также в некоторых биологических свойствах. Степень иммуносупрессивной активности МСК может быть

связана с набором антигенов, экспрессируемых на поверхности клеток, в том числе кластеров дифференцировки — CD106 и коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276.

Целью нашего исследования являлась оценка уровня экспрессии CD106 и коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 на МСК плаценты (П-МСК) и костного мозга (КМ-МСК) в зависимости от продолжительности культивирования клеток.

Было исследовано 26 образцов МСК. Методом иммунофенотипического анализа установлено, что уровень экспрессии CD273 был выше в 2 раза, CD274 — в 1,5 раза и CD106 — в 1,4 раза на П-МСК, чем на КМ-МСК ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о более высоком базовом уровне экспрессии поверхностных антигенов на П-МСК, участвующих в модуляции иммунологической активности, что, возможно, связано с их биологической функцией, а именно, значительной ролью в обеспечении фетоматеринской толерантности.

Сравнительный анализ уровня экспрессии молекул на П-МСК 3-го и 6-го пассажей показал, что длительная экспансия *in vitro* приводила к снижению экспрессии CD273, CD274, а также CD106 на 21,6, 21 и 12 % соответственно ($p < 0,05$). Более высокий иммуносупрессивный потенциал П-МСК ранних пассажей делает применение этих клеток более предпочтительным для иммуносупрессивной клеточной терапии.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, плацента, костный мозг, иммунофенотип, иммуносупрессия.

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой тип мультипотентных стволовых клеток мезодермального происхождения, которые составляют специализированное микроокружение в различных тканях организма, обладают способностью к самообновлению и ортодоксальной дифференцировке в клетки мезенхимальных тканей, такие как остециты, хондроциты и адипоциты [1].

В настоящее время МСК обнаружены практически во всех тканях организма, но наиболее доступными и востребованными источниками являются костный мозг, жировая ткань, а также ткани перинатального происхождения (пуповина, пуповинная кровь, плацента). Сравнительные исследования МСК, полученных из различных тканей, показали наряду с однотипными основными характеристиками клеток, различия в пролиферативной активности и дифференцировочном потенциале, а также биологических свойствах клеток. МСК костномозгового происхождения (КМ-МСК) демонстрируют более высокую способность к хондро- и остеоиндукции, а также поддержке гемопоэза. МСК, полученные из перинатальных тканей, обладают более высоким пролиферативным потенциалом и эффективнее поддаются дифференцировке в эндотелиальном направлении. В то же время нет единого мнения о выраженности иммуносупрессивной активности при сравнении различных типов МСК. Гетерогенность некоторых свойств МСК различного происхождения является важным критерием для подбора оптимального источника МСК для проведения клеточной терапии.

В настоящее время в практической медицине наиболее востребовано применение МСК

в качестве материала для клеточной терапии таких иммуноопосредованных заболеваний, как реакция «трансплантат против хозяина», болезнь Крона, рассеянный склероз и др. [2]. Терапевтическое иммуносупрессивное действие МСК осуществляется как на паракринном уровне, так и при непосредственном взаимодействии МСК с клетками-мишенями. Некоторые исследователи связывают отличия иммуносупрессивных свойств МСК различного тканевого происхождения с набором антигенов, экспрессируемых на поверхности клеток, в том числе кластеров дифференцировки CD106, а также коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276.

CD106 (VCAM-1) — белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов, который участвует в передаче межклеточных сигналов, а также адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток. На поверхности МСК VCAM-1 участвует в реализации начальных стадий иммуносупрессии. Белки адгезии ICAM-1 и VCAM-1 способствуют установлению непосредственных межклеточных контактов МСК с Т-лимфоцитами, что приводит к ингибированию их функциональной активности по принципу паракринного механизма. Более того, экспериментальные исследования показали, что именно популяция CD106⁺ МСК обладает наиболее выраженными иммуносупрессивными и проангиогенными свойствами, которые связывают не только с высокой адгезионной способностью клеток, но и со способностью секретировать высокий уровень иммунорегуляторных и проангиогенных цитокинов и факторов (СОХ-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) [3–5]. Тем не менее, уровень экспрессии CD106⁺ на поверхности МСК различного тканевого происхождения значительно варьирует. Было показано, что в

популяции МСК из тканей плаценты он более высокий, чем на МСК из костного мозга и значительно выше, чем на МСК из жировой ткани и пуповинной крови [3, 4].

В систему взаимодействия МСК с Т-лимфоцитами и ингибирования иммунных реакций также вовлечены коингибиторные молекулы CD273, CD274, CD275 и CD276, лигандами которых являются молекулы PD-1/2 и ICOS (CD278) [6–7]. Коингибиторные молекулы участвуют в непосредственном ингибировании функций Т-лимфоцитов минуя IDO — путь. Экспрессия этих молекул на поверхности МСК праймируется $IFN\gamma$. Тем не менее, в МСК, полученных из перинатальных тканей, отмечается базовый повышенный уровень экспрессии коингибиторных молекул, что связывают с его существенной ролью в обеспечении фетоматеринской толерантности.

Цель работы — исследование и сравнение уровня экспрессии CD106 и коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 на МСК плаценты и костного мозга в зависимости от продолжительности культивирования клеток.

Материалы и методы. МСК плаценты (П-МСК) были получены из фрагментов послеродовой плаценты ($n = 10$) после *оперативных или естественных родов*, после получения информированного согласия роженицы на забор плаценты. МСК выделяли ферментативным методом или методом эксплантации. Для получения культуры клеток ферментативным методом суспензию фрагментов обрабатывали 0,14%-м раствором коллагеназы I в течение 30 мин с последующей фильтрацией клеток через 100 μ m нейлоновый фильтр. Полученные диссоциированные клетки культивировали в среде IMDM (Life Technologies, США) с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Life Technologies, США). Для получения культуры методом эксплантации суспензию фрагментов плаценты в стандартной среде помещали в культуральный флакон (Sarstedt, Германия), покрывая дно тонким слоем.

КМ-МСК получали из проб костного мозга здоровых доноров, являвшихся донорами гемопоэтических стволовых клеток для аллогенной трансплантации ($n = 3$). Мононуклеарные клетки выделяли на Гистопаке плотностью 1,077 (Sigma, США), дважды отмывали в растворе Хенкса, ресуспендировали в среде IMDM с 10 % (ЭТС) и переносили в концентрации $2-3 \cdot 10^6$ /мл во флаконы. Культивирование проводили при 37 °C в CO₂ инкубаторе. Через 48 ч проводили смену среды. При достижении 70–90 % конфлюэнтного слоя клетки снимали с

поверхности флакона 0,25%-м раствором трипсин — ЭДТА и рассаживали в новые флаконы по $1 \cdot 10^6$.

П-МСК и КМ-МСК культивировали с проведением 6 пассажей.

Для иммунофенотипического анализа использовали МСК 3-го и 6-го пассажей. Иммунофенотипический анализ МСК проводили с использованием набора моноклональных антител (МКА) в составе CD73 APC, CD90 FITC, CD105 VioBlue, CD34 PE, CD45 PE, CD14 PE, CD19 PE, Anti-HLA-DR VioGreen и изотипического контроля, входящего в набор (MSC Phenotyping Kit human, Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Для определения VCAM-1 и коингибиторных молекул на поверхности МСК использовали МКА CD106, CD273, CD274, CD276, меченные APC-Vio770, PE, PE-Vio615, FITC соответственно (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Анализ выполняли согласно прилагаемой инструкции. Учет результатов проводили на лазерном проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Анализ иммунофенотипических данных выполняли с применением программного обеспечения Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку данных проводили с применением программ Statistica 6.0 и Excel. Использовали методы описательной статистики, непараметрического теста Манна — Уитни и Краскела — Уоллиса. Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Согласно установленным международным обществом клеточной терапии (ISCT) минимальным критериям для определения идентичности МСК было проведено определение экспрессии дифференцировочных антигенов CD90, CD73, CD105, характерных для МСК, и отсутствие антигенов гемопоэтических клеток CD14/CD45/CD34/19 и антигена гистосовместимости 2-го класса — HLA-DR. Сравнение количества клеток, экспрессирующих маркеры МСК, в культурах, полученных из послеродовой плаценты и костного мозга, представлены в таблице 1.

Полученные результаты свидетельствуют, что культуры клеток как из костного мозга, так и из плаценты соответствуют критериям принадлежности к популяции МСК. Необходимо отметить, что КМ-МСК экспрессировали CD90 на более высоком уровне по сравнению с П-МСК ($p < 0,05$). Тем не менее, минимальный порог позитивности по данному маркеру для МСК составляет более 95 %.

Таблица 1 — Иммунофенотип МСК из различных источников

Источник МСК	Антигены дифференцировки и гистосовместимости; медиана (min – max)				
	CD90 + (%)	CD105+ (%)	CD73+ (%)	CD45+/CD14+/CD34+/19+ (%)	HLA-DR (%)
П-МСК (n = 10)	95,0* (93,9–98,8)	97,0 (95,5–99,4)	99,1 (96,5–100,0)	1,95 (0,1–4,6)	2,3 (0,2–3,8)
КМ-МСК (n = 3)	98,2 (97,8–98,9)	97,5 (95,3–97,6)	98,0 (97,4–99,8)	1,7 (1,0–1,8)	0,8 (0,7–1,8)
Достоверность различий (p)	0,020	0,564	0,470	0,613	0,773

* $p < 0,05$ при сравнении П-МСК и КМ-МСК.

Было выполнено иммунофенотипическое исследование экспрессии коингибиторных мо-

лекул CD273, CD274, CD276 и CD106 на КМ-МСК и П-МСК (рисунок 1).

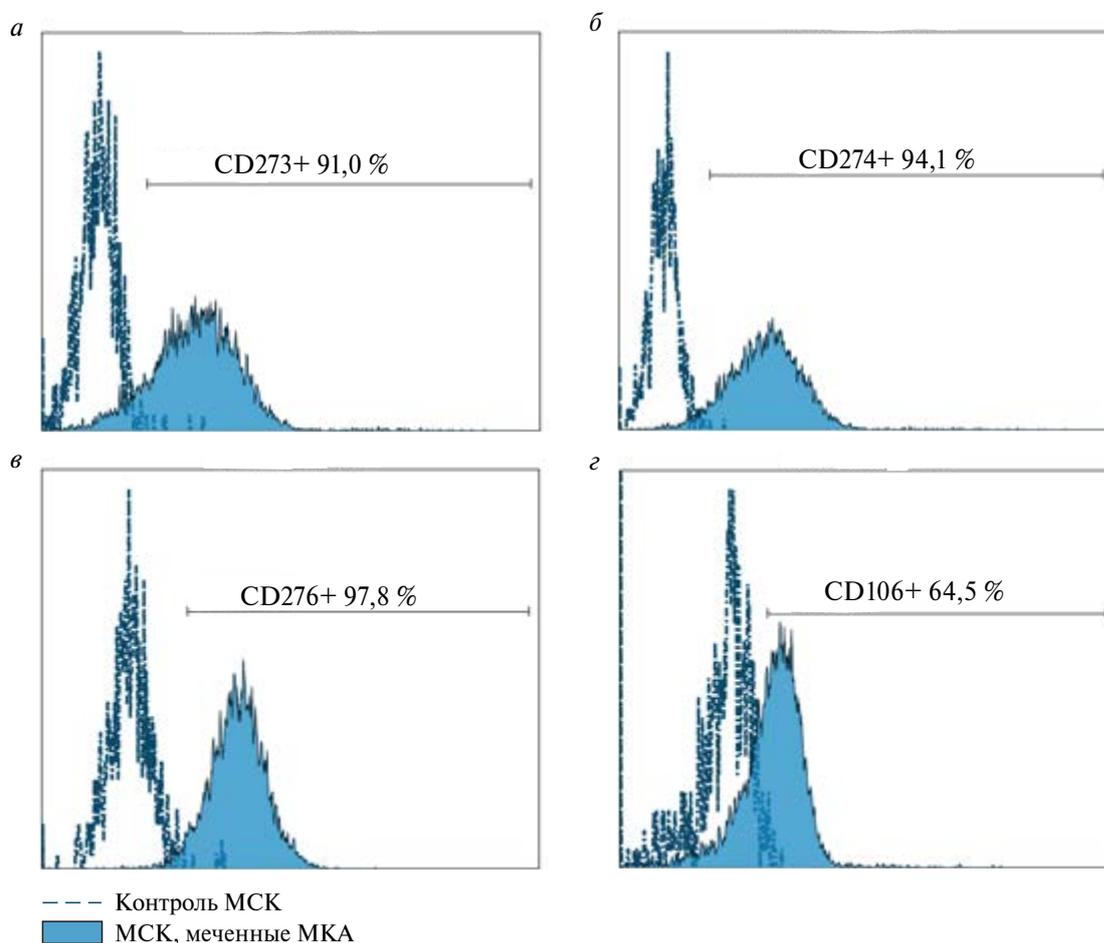


Рисунок 1 — Пример экспрессии коингибиторных молекул CD273 (а), CD274 (б), CD276 (в) и CD106 (г) в культуре П-МСК

Уровни экспрессии CD273, CD274 на П-МСК были значимо выше, чем на КМ-МСК ($p < 0,05$) и для П-МСК составляли 93,2 % (65,0–98,3 %) и 96,1 % (82,3–98,7 %), а для КМ-МСК — 45,0 % (41,2–47,2 %) и 63,6 % (57,6–

67,5 %) соответственно. Экспрессия коингибиторной молекулы CD276 была самой высокой из анализируемых, варьировала в диапазоне 95,5–99,8 % и не отличалась для культур П-МСК и КМ-МСК (рисунок 2).

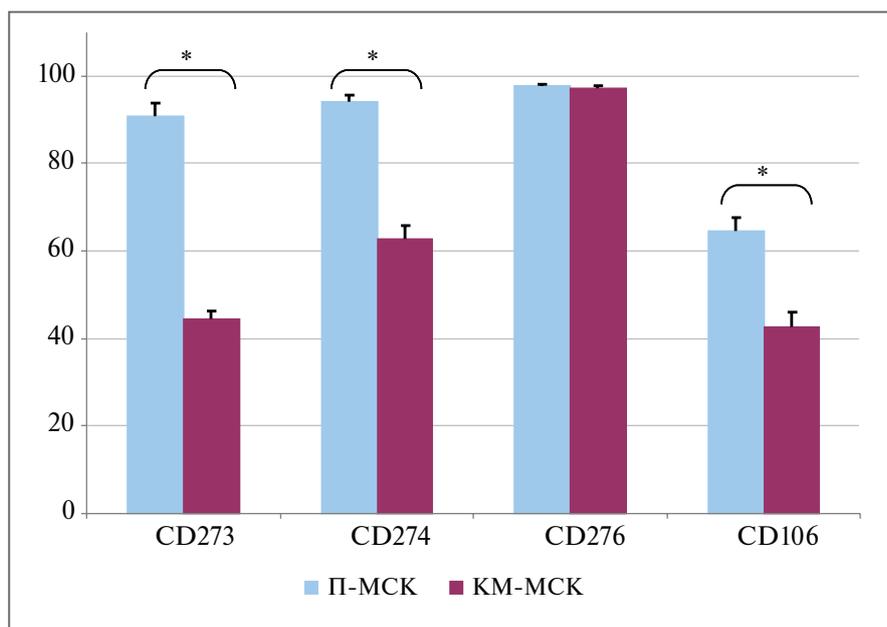


Рисунок 2 — Уровень экспрессии коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 и CD106 в культурах П-МСК и КМ-МСК (* $p < 0,05$)

Экспериментальные исследования показали, что МСК, полученные из других перинатальных тканей, а именно, пуповины также экспрессируют CD273, CD274 на более высоком уровне (более 90 %) по сравнению с КМ-МСК (70–71 %) [7]. По литературным данным, CD273 и CD274 при связывании с рецептором PD-1 на Т-клетках способны подавлять различные функции Т-клеток, включая пролиферацию и продукцию цитокинов, таких как IL-2 и IFN γ [7]. Кроме того, CD273 и CD274 могут индуцировать противовоспалительный фенотип дендритных клеток, что также редуцирует активность Т-клеток [7]. Оценка экспрессии рецептора VCAM-1 показала, что П-МСК экспрессируют данный маркер на более высоком уровне 61,4 % (49,1–79,6 %), по сравнению КМ-МСК — 42,6 % (36,6–48,7 %) ($p < 0,05$). Наши результаты сопоставимы с данными представленными Z. X. Yang с соавт., которые установили, что субпопуляция клеток, экспрессирующая CD106, составляет 65,01 % в культуре МСК, полученных из ворсин хориона плаценты, 32,04 % — МСК из костного мозга, 7,44 % — МСК из пупочного канатика и 0,73 % — МСК жировой ткани [3]. Z. C. Nan с соавт. также показали более высокий уровень экспрессии CD106 ($68,2 \pm 7,9$ %) на МСК плацентарного происхождения по сравнению с другими типами МСК (МСК костного мозга — $13,0 \pm 10,5$ %, МСК пуповинной крови — $4,0 \pm 2,1$, МСК

жировой ткани — $0,2 \pm 0,2$) [4]. Как упоминалось выше, субпопуляция CD106+ МСК отличается более высокой адгезионной способностью к Т-лимфоцитам, а также высоким уровнем секреции иммунорегуляторных цитокинов, что позволяет более эффективно ингибировать их активацию [5].

Таким образом, П-МСК отличаются от КМ-МСК более высоким базовым уровнем экспрессии поверхностных антигенов, участвующих в модуляции иммунологической активности, что, вероятно, связано с их биологической функцией в подавлении материнского иммунного ответа на наследуемые от отца аллоантигены.

Было проведено исследование влияния длительности культивирования П-МСК на сохранность экспрессии коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 и CD106 на П-МСК (рисунок 3).

Установлено, что экспрессия всех исследуемых маркеров значительно снижается при длительном культивировании П-МСК с 3-го до 6-го пассажа: CD273 — на 21,6 %, CD274 — на 21 %, CD276 — на 12,5 % и CD106 — на 12 % ($p < 0,05$). При этом позитивность по маркерам CD274 и CD106 П-МСК 6-го пассажа после экспансии *in vitro* становится на уровне КМ-МСК 3-го пассажа. Подобное снижение CD106+ субпопуляции П-МСК при культивировании было установлено и у других исследователей [3].

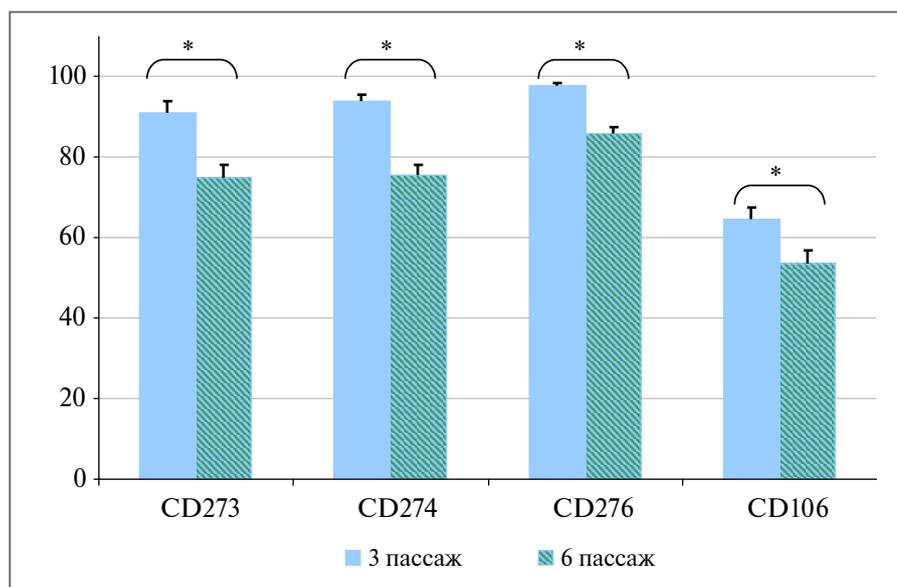


Рисунок 3 — Уровень экспрессии коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 и CD106 в культуре П-МСК на 3 и 6 пассажах (* $p < 0,05$)

Заключение. Таким образом, сравнительное исследование иммунофенотипа клеток доказывает неоднородность популяции МСК различного тканевого происхождения. Уровень экспрессии CD273, CD274 и CD106 был выше чем на КМ-МСК в 2 раза, в 1,5 раза и в 1,4 раза соответственно ($p < 0,05$), что может свидетельствовать об их более высоком иммуносупрессивном потенциале. Высокая пролиферативная активность П-МСК делает их лиди-

рующими кандидатами для производства высококлеточного продукта при длительном культивировании. Тем не менее, длительная экспансия *in vitro* приводила к снижению экспрессии маркеров CD273, CD274, а также CD106 на 21,6, 21, и 12 % соответственно ($p < 0,05$), что может приводить к редукции иммуносупрессивных свойств МСК поздних пассажей, в связи с чем рекомендуется отбор П-МСК ранних пассажей для клинического применения.

Список цитированных источников

1. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // *Cytotherapy*. — 2006. — Vol. 8. — P. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
2. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience / K. Le Blanc [et al.] // *J. Intern. Med.* — 2007. — Vol. 262. — P. 509–525. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x.
3. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties / Z. X. Yang [et al.] // *PLoS. One.* — 2013. — Vol. 8. — P. e59354. DOI : 10.1371/journal.pone.0059354.
4. New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells / Z. C. Han [et al.] // *Biomed. Mater. Eng.* — 2017. — Vol. 28. — P. 29–45. DOI: 10.3233/BME-171622.
5. Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression / G. Ren [et al.] // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 184. — P. 2321–2328. DOI: 10.4049/jimmunol.0902023.
6. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells / R. Chinnadurai [et al.] // *J. Immunol.* — 2014. — Vol. 192. — P. 1491–1501. DOI: 10.4049/jimmunol.1301828.
7. What Makes Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Superior Immunomodulators When Compared to Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells? / R. N. Bórcia [et al.] // *Stem. Cells. Int.* — 2015. — № 4 (5). — P. 1–14. DOI: 10.1155/2015/583984.

