

На правах рукописи

ГОРЮНОВ КИРИЛЛ ВЛАДИМИРОВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМ-
НЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА Т-ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

кандидат химических наук

Рубцов Юрий Петрович

Официальные оппоненты:

Меньшиков Михаил Юрьевич

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Гольдштейн Дмитрий Вадимович

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 20__ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://morfolhum.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Хроническое воспаление – это сложный патологический процесс, который приводит к дисфункции органов и тканей. В развитии хронического воспаления важную роль играют нарушения контроля пролиферации, дифференцировки и физиологической активности клеток иммунной системы [Libby P. et al., 2006; Iwalewa E.O. et al., 2007]. За последние годы значительно увеличилось количество хронических аутоиммунных заболеваний, связанных с хроническим воспалением [Esch T. et al., 2002], однако до сих пор не найдены эффективные методы их терапии. Открытие у мезенхимных стромальных клеток (МСК) иммуномодулирующих свойств в сочетании с их низкой иммуногенностью *in vitro* и *in vivo* [Bartholomew A. et al., 2002] позволяет предположить возможность их использования как альтернативного подхода в терапии аутоиммунных заболеваний. Вместе с тем появляются клинические данные, показывающие неэффективность применения МСК [Lucchini G. et al., 2010; Mohyeddin Bonab M. et al., 2007; Wang D. et al., 2014]. Несмотря на активное изучение данной проблемы, остается много нерешенных и противоречивых вопросов. В связи с этим, необходимы дальнейшие исследования, целью которых является детальное изучение и расшифровка молекулярных механизмов взаимодействия между МСК и клетками иммунной системы, в частности, лимфоцитами, как основными участниками, запускающими аутоиммунные реакции.

Степень разработанности темы исследования. Согласно современным представлениям, при развитии патологических состояний механизмы регуляции иммунитета играют ключевую роль [Nathan C., 2002]. В настоящее время обнаружены иммунорегулирующий, пролиферативный и репаративный потенциалы МСК [Bartholomew A. et al., 2002; Kalinina N.I. et al., 2011]. В условиях воспаления установлено иммуносупрессорное влияние МСК на клетки иммунной системы, особенно на лимфоциты [Rubtsov Y.P. et al., 2012]. Применение МСК для лечения хронического воспаления затруднено в связи с недостаточной характеристикой механизмов взаимного влияния МСК и лимфоцитов. Знания в этой области остаются неполными. В первую очередь, это касается поведения клеток *in vivo* в связи с большим числом факторов, влияющих как на МСК, так и на лимфоциты. При этом не все эти факторы удается детектировать и оценить в экспериментах на животных. Кроме того, большинство данных относительно МСК человека получено в экспериментах *in vitro*, результаты которых часто противоречат друг другу. Изучение механизмов взаимодействия между МСК и лимфоцитами выявило сложную систему регуляции, контролирующую как воспаление, так и регенерацию [Воротников А. В. и др., 2012; Зубкова Е. С. и др., 2012; Вялкина М. В. и др., 2017]. В рамках существующих представлений секретом лимфоцитов создает воспалительное микроокружение. МСК, в свою очередь, в результате полученных от лимфоцитов сигналов, активируют гены, кодирующие ферменты, которые негативно влияют на активацию и жизнеспособность лимфоцитов. Несмотря на общее понимание процесса взаимодействия МСК и лимфоцитов и идентификацию молекул, принимающих участие в реализации этого взаимодействия между двумя типами клеток, остается много неизученных на клеточном и молекулярном уровнях аспектов, требующих исследования [English K. et al., 2013]. В литературе описаны несколько эффекторных молекул, критически важных для влияния МСК на лимфоциты, среди них - индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO) [DelaRosa O. et al., 2009], оксид азота II (NO) [Ren G. et al., 2008], простагландин E2 (PGE2) [Aggarwal S. et al.,

2005]. Однако в последнее время стали появляться работы об участии других факторов, таких как галектины [429], белок TSG6 (белок, стимулированного TNF- α гена 6) [Lee R.H., 2009] и ряд других. Это указывает на то, что взаимодействие МСК и лимфоцитов гораздо сложнее, чем представлялось ранее. Контактные механизмы, идентификации которых посвящены немногочисленные исследования, охарактеризованы гораздо хуже. Установлено, что в контактных взаимодействиях МСК и лимфоцитов могут принимать участие следующие мембранные рецепторы/лиганды: Fas/FasL [Akiyama K. et al., 2012], PD-1/PD-L1 [Luz-Crawford P. et al., 2012], а также молекулы адгезии ICAM-1, VCAM-1 [Ren G. et al., 2010] и другие. Однако большинство механизмов установлено на мышинных МСК, а участие целого ряда контактных механизмов не подтверждено на МСК человека. Помимо этого, до сих пор не решен вопрос о балансе между контактными и бесконтактными молекулярными механизмами действия МСК на лимфоциты [Shi Y. et al., 2010; Andreeva E. et al., 2017].

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

Задачи исследования:

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

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

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

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

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

Научная новизна работы

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость

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

Методология и методы диссертационного исследования

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

Основные положения, выносимые на защиту:

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

5. МСК способны поддерживать выживание интактных Т-лимфоцитов в отсутствие стимуляции, сопровождающееся увеличением поверхностного уровня CD25 и молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 на CD4 Т-хелперах.

Степень достоверности и апробация результатов

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

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

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

Публикации. Материалы диссертации отражены в 9 опубликованных печатных работах, из них 3 статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, 1 статья, не входящая в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, 5 публикаций в материалах российских и международных конференций.

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

Объем и структура научно-квалификационной работы

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы

Для выполнения работы использовали ингибиторы iNOS (LNMMA) и IDO (1-MT) фирмы Sigma (США). В ходе исследования применяли несколько видов антител: для иммуноблоттинга против IDO (H-110, sc-25808, Santa Cruz, США) и iNOS (aa 781-798, Clone 2D2-B2, MAB9502, R&D Systems, США), для активации лимфоцитов - CD28 NA/LE (BD 555725, США), CD3 NA/LE (BD 555336) и конъюгированные с флуорофорами для цитометрии к маркерам CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, ICAM-1, CD73, CD90, CD105, HLA-DR производства BD Pharmingen и Biolegend (США), а также блокирующие антитела к ICAM-1 (Santa Cruz).

Доноры МСК и лимфоцитов

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

Выделение и культивирование МСК из жировой ткани человека

МСК получали путем измельчения ткани с последующей ферментативной обработкой [Zuk. et al., 2001]. Выделенные клетки культивировали в среде DMEM/F12 (HyClone), содержащей 100 ед/мл пенициллина (ПанЭко), 100 ед/мл стрептомицина (ПанЭко), 2 мМ глутамин (ПанЭко), 10 мМ раствор HEPES (HyClone), 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone) (далее стандартная среда культивирования). В эксперименте использовали клетки четвертого пассажа.

Выделение лимфоцитов из периферической крови

Лейкоциты периферической крови (ЛПК) получали методом градиентного центрифугирования на фиколле [Vöyum A. et al., 1968]. Отобранную фракцию лейкоцитов либо стимулировали с помощью ФГА или антител к Т-клеточному рецептору, либо инкубировали с флуорофор-конъюгированными антителами CD45, CD3, CD4 (BD) для сортировки методом проточной цитофлуориметрии с целью выделения популяции Т-хелперов с фенотипом CD45⁺CD3⁺CD4⁺. Процедуру проводили на клеточном сортере BD FACSAria™ III (BD Bioscience, США).

Стимуляция лимфоцитов in vitro

Стимуляцию лимфоцитов проводили двумя способами: для оценки пролиферации использовали лектин фитогемагглютинин (ФГА) 10 мкг/мл (Sigma L8754-25MG) в течение 6 часов при 37°C и 5% CO₂, во всех других случаях - антитела к компоненту системы Т-клеточного рецептора CD3 (BD Bioscience, США) 1мкг/мл и молекуле костимуляции CD28 (BD Bioscience, США) 0,5 мкг/мл в течение 48 часов.

Совместная инкубация МСК и лимфоцитов

МСК жировой ткани человека инкубировали 48ч в стандартной среде в 12-луночных планшетах в концентрации 50-55·10³ клеток на лунку при 37°C. Затем среду культивирования меняли на новую и добавляли активированные или не стимулированные ЛПК

(либо очищенную популяцию CD4 лимфоцитов). МСК и лимфоциты инкубировали в контактных и бесконтактных условиях с использованием полупроницаемых мембран (Transwell) с диаметром пор 0,4 мкм (Greiner, Австрия) в течение 48 ч при 37°C или в течение более длительного времени в зависимости от эксперимента.

Оценка пролиферации ЛПК

Для оценки пролиферации ЛПК использовали набор реактивов CyQUANT®NF Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen). МСК и активированные ЛПК инкубировали в указанных соотношениях (1/100, 1/50, 1/25, 1/12,5 МСК к ЛПК, соответственно) 1-6 суток при 37°C. Супернатант, содержащий ЛПК, центрифугировали (200g, 15 мин). Далее все действия проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Окрашивание клеток антителами и анализ с помощью проточной цитофлуориметрии

В суспензию клеток (МСК или лимфоцитов) добавляли конъюгированные с флуорофорами антитела к соответствующим клеточным маркерам (CD90, CD73, CD105, HLA-DR, CD86, ICAM-1, CD3, CD4, CD25, CD45). Все процедуры осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ проводили на проточном цитометре FACS CANTO II (BD Bioscience, США).

Оценка апоптоза лимфоцитов

Для оценки апоптоза использовали окраску лимфоцитов Аннексином-V-PE (BD Bioscience, США) по рекомендациям производителя. Анализ проводили на проточном цитометре FACS CANTO II (BD Bioscience, США). Уровень апоптоза определяли по доле AnnexinV+7AAD- лимфоцитов в образце.

Получение прижизненных изображений клеток

МСК и лимфоциты, меченные флуоресцентными красителями: МСК с CellTrace™ Calcein Green, AM (ThermoFischer), а ЛФ с CellTrace™ Calcein Red-Orange, AM (ThermoFischer) по рекомендациям производителя, инкубировали как описано в пункте «Совместная инкубация МСК и лимфоцитов» Изображения клеток получали с помощью инвертированного микроскопа Axio Vert A1 (Carl Zeiss, Германия). Для флуоресцентной микроскопии применяли объектив с 10x увеличением. Возбуждение и детекцию флуоресценции проводили на длинах волн 488/500–530 нм (МСК) и 543/560-590 нм ЛФ. Для получения фазово-контрастных изображений использовали объектив с 20x увеличением.

ПЦР в реальном времени

Для выделения тотальной РНК использовали реагент TRIzol (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя, кДНК синтезировали при помощи транскриптазы Superscript III (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Определение экспрессии генов интереса осуществляли полуколичественным методом Лайвака [Livak K.J. et al., 2001]. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени использовали коммерческий набор реактивов 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и иммуоблоттинг

Клеточные осадки лизировали буфером, содержащим 50 мМ Трис-НСl pH 6,8, 1% ДСН (додецилсульфат натрия) 10% глицерин, в течение 30 мин на льду. Концентрацию тотального белка измеряли при помощи коммерческого набора реактивов Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225 Thermo Scientific, реакция с бигинхониновой кислотой [Smith P.

К. et al., 1985)]. Электрофоретическое разделение проводили по методу Леммли [Laemmli U.K., 1970]. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra RPN303E GE Healthcare) осуществляли по методу [Towbin H. et al., 1979]. Люминисцентный сигнал от антител, конъюгированных с пероксидазой, получали с помощью SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher) и детектировали при помощи рентгеновской фотопленки X-ray Film for Western Blot Detection (34088 Thermo Scientific). Для проявки использовали реактивы фирмы Kodak (США).

Ингибиторный анализ

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

В случае IDO анализировали содержание продукта его ферментативной реакции - кинуренина - с помощью набора коммерческих реактивов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с инструкциями производителя (LDN, Германия). Чтобы оценить уровень ферментативной активности iNOS использовали коммерческий набор реактивов для детекции NO (K262-200, Biovision). Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Обработка данных

Для статистического анализа использовали программы STATISTICA 6 и SIGMA PLOT. Тест на нормальность проводили методом Шапиро-Уилка, с попарным сравнением Шидока-Холма или Даннета. Для непараметрических распределений использовали однофакторный дисперсионный анализ на рангах Крускала – Уоллиса с последующим тестом Тьюки. Для анализа нескольких выборок использовали критерий Манна-Уитни. Для построения графиков применяли программу GRAPHPAD PRISM 5, полученные изображения клеток обрабатывали в программе ImageJ.

Результаты и их обсуждение

Определение оптимальных условий для изучения иммуносупрессии МСК

В работе использовали *in vitro* модель совместной инкубации МСК и лимфоцитов, в составе ЛПК, либо очищенных с помощью сортировки CD4 Т-клеток. Известно, что Т-клетки составляют от 40 до 70% всех ЛПК, при этом наибольшая популяция представлена CD4 лимфоцитами (30-50% от всех ЛПК) [Corkum С.Р. et al., 2015]. Помимо этого, установлено, что при стимуляции ЛПК специфическими антителами к CD3 и CD28 происходит активация только Т-клеток [Martkamchan S. et al., 2016]. В данной работе под лимфоцитами мы будем подразумевать CD4 Т-лимфоциты в составе ЛПК. Для выявления иммунорегуляторных свойств МСК варьировали 3 параметра: время инкубации (от 2 до 5 суток), соотношение между клетками (МСК к ЛПК: 1/10, 1/25, 1/50, 1/100), а также наличие или отсутствие контактных взаимодействий между МСК и лимфоцитами. Для сравнения были использованы лимфоциты, инкубируемые без МСК в стандартной среде культивирования. Схема эксперимента представлена на Рис. 1.

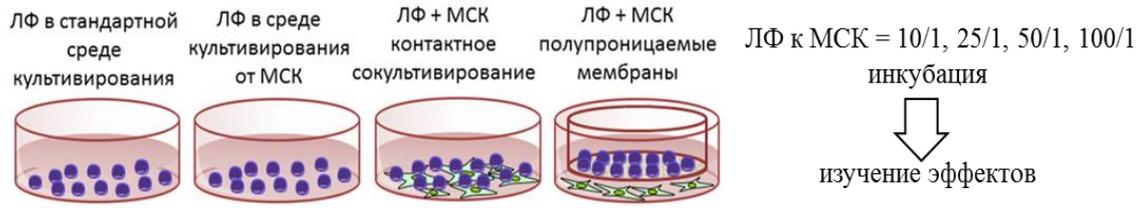


Рисунок 1. - Подбор условий для изучения иммуносупрессии.

МСК снижают пролиферацию активированных лимфоцитов

Для оценки иммуносупрессорного потенциала МСК использовали уменьшение скорости пролиферации лимфоцитов под действием МСК, которую измеряли с помощью детекции количества ДНК, содержащегося в лимфоцитах после инкубации с МСК и в контрольных культурах (ЛПК без МСК). Из наших данных следует, что МСК обладают максимальным негативным действием на пролиферацию через 48 часов совместной инкубации при соотношении клеток МСК к ЛПК 1/25; при этом, наиболее эффективным подавление было при контактных взаимодействиях между клетками. Снижение пролиферации также зарегистрировали оценкой количества ЛПК после инкубации с МСК (Рис. 2А-Б.).

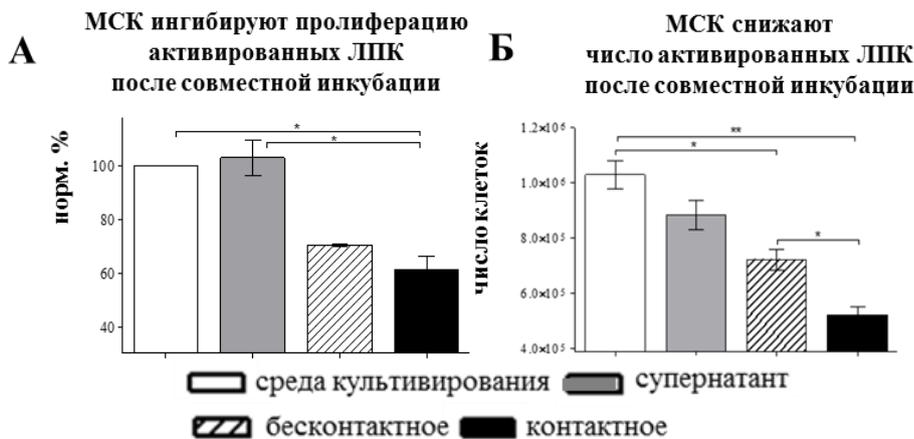


Рисунок 2. Изучение иммуносупрессорных свойств МСК. (А) Оценка пролиферации активированных (ФГА 10 мкг/мл) ЛПК при совместной инкубации с МСК. (Б) Количество ЛПК после инкубации с МСК; данные представлены как $M \pm SEM$, $N=5$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

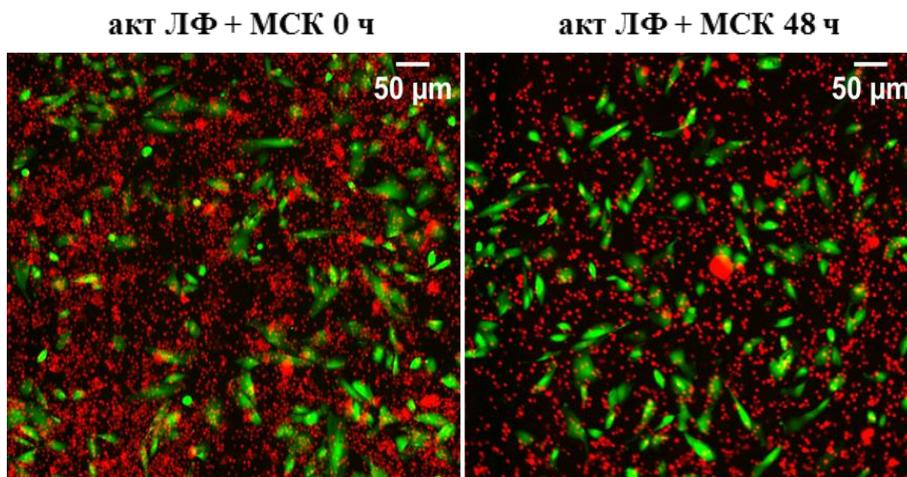


Рисунок 3. Инкубация с МСК снижает число стимулированных лимфоцитов. Микрофотографии контактной инкубации МСК и ЛФ (флуоресценция 10x увеличение) в начале и через 48 ч. МСК - CellTrace™ Calcein Green, АМ, лимфоциты - CellTrace™ Calcein Red-Orange, АМ.

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

Из данных литературы известно, что МСК способствуют снижению поверхностного уровня α -субъединицы рецептора IL-2 (CD25) [Le Blanc K et al., 2004], жизненно важного «фактора роста» лимфоцитов, который обеспечивает их деление и выживание [Benczik M. et al., 2004]. По нашим данным, совместная инкубация МСК с активированными лимфоцитами также приводила к снижению доли CD4CD25⁺ клеток (Рис. 4А.). При этом в контактных условиях инкубации снижение поверхностного уровня CD25 на CD4 лимфоцитах после инкубации с МСК было максимальным. Сравнение иммуносупрессорной активности МСК (снижение доли CD4CD25⁺ клеток) на Т-клетки в составе ЛПК или очищенную CD4 популяцию значительных различий не выявило, что говорит о специфичности блокирующего ответа МСК на CD4 лимфоциты и согласуется с данными, полученными другими авторами [Tse W et al., 2003] (Рис. 4А-Б).

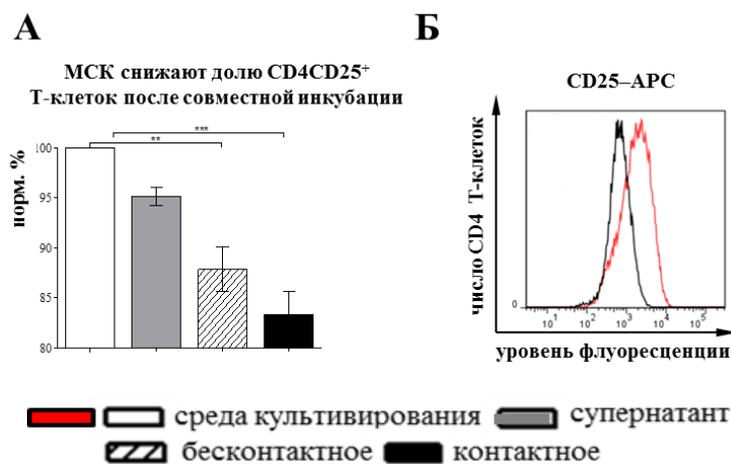


Рисунок 4. Влияние МСК на уровень CD25 на поверхности CD4 лимфоцитов при совместной инкубации. (А) Изменение доли CD4CD25⁺ клеток в популяции активированных CD4 лимфоцитов после совместной инкубации с МСК по сравнению с контролем. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=4$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (Б) Репрезентативные гистограммы сравнения доли CD25⁺ клеток в очищенной популяции CD4 Т-хелперов при контактных условиях инкубации с МСК относительно контроля.

Снижение пролиферации лимфоцитов часто связано с индукцией программируемой клеточной гибели. Поэтому мы предположили, что иммуносупрессорное действие МСК может быть связано со способностью индуцировать спонтанный апоптоз у Т-клеток. Однако влияния МСК на спонтанный апоптоз CD4 лимфоцитов нами обнаружено не было (данные не представлены). Таким образом, мы показали, что инкубация МСК с активированными лимфоцитами снижает скорость их пролиферации. Это снижение не связано с индукцией спонтанного апоптоза в Т-клетках под действием МСК, но сопровождается уменьшением поверхностного уровня CD25 на лимфоцитах. На основе полученных данных мы полагаем, что взаимодействие МСК с лимфоцитами вызывает индукцию состояния анергии у Т-клеток, описанного в литературе [Zarria E. et al., 2005].

Участие IDO в бесконтактном механизме иммуносупрессии МСК

Известно, что секретом МСК способен осуществлять иммуносупрессорное действие на лимфоциты. Мы добавили супернатанты от контактных и бесконтактных культур МСК и лимфоцитов к активированным лимфоцитам/очищенной популяции CD4 Т-клеток и к МСК. Через 48 часов после добавления супернатантов мы оценивали долю

CD4CD25⁺ лимфоцитов, а в МСК - изменение уровня мРНК генов, ответственных за иммуносупрессию, в частности: индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), NO-синтазы II типа (NOS2), циклооксигеназы 2 (PTGS2), фактора роста опухоли β (TGFB). Процент CD4CD25⁺ клеток был снижен, как в общей популяции лимфоцитов (Рис. 5.), так и в очищенной популяции CD4 клеток (данные не представлены) по сравнению с контролем (лимфоциты без МСК), причем добавление супернатанта от контактной инкубации приводило к максимальному снижению доли CD25⁺ клеток. Добавление супернатантов к МСК вызывало в них индукцию экспрессии гена IDO (Рис. 5Б.).

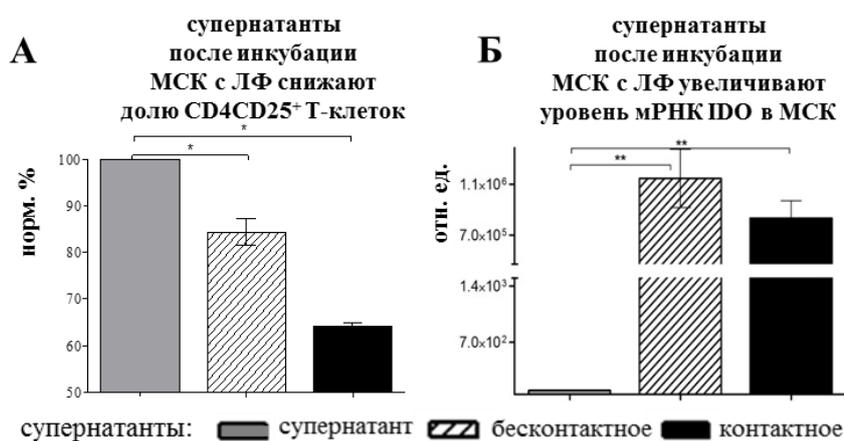


Рисунок 5. Влияние супернатантов после совместной инкубации на МСК и активированные ЛФ. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, $N=3$. IDO - индоламин-2,3-диоксигеназа, супернатант – кондиционная среда от МСК, бесконтактное – супернатант от бесконтактной инкубации, контактное – супернатант от контактной инкубации (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Наши дальнейшие эксперименты показали, что совместная инкубация МСК с активированными лимфоцитами, согласно нашим результатам, приводит к высокому уровню мРНК IDO (данные не представлены), которое коррелирует с высоким уровнем белка IDO в МСК. При этом в случае бесконтактных взаимодействий содержание IDO на уровне белка в МСК было значительно выше (рисунок 6).

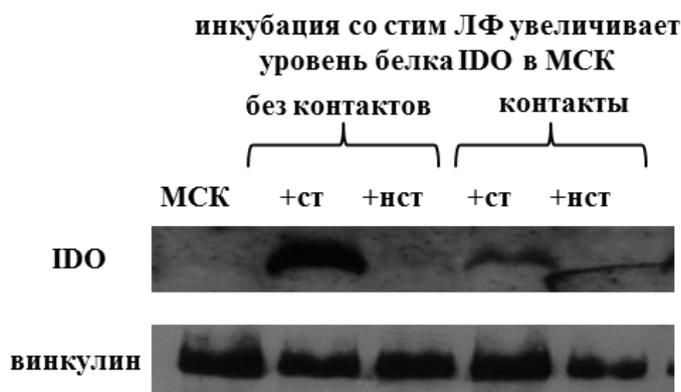


Рисунок 6. Анализ количества IDO в МСК при инкубации с лимфоцитами. Репрезентативные данные иммуноблоттинга лизатов МСК, полученных при инкубации со стимулированными и не стимулированными лимфоцитами. ст – стимулированные лимфоциты, нст – не стимулированные лимфоциты.

IDO является не секретируемым ферментом [Schmidt S.V. et al., 2014], однако из данных литературы известно токсическое действие продуктов ферментативной активности IDO (кинуренин и его производные) на Т-клетки [Fallarino F. et al., 2002]. Чтобы подтвердить участие IDO в иммуносупрессорном бесконтактном механизме МСК активность IDO блокировали ингибитором - 1-метил-D,L-триптофаном (1-МТ) в культурах МСК с лимфоцитами. Ингибирование IDO приводило к увеличению доли CD4CD25⁺ клеток при бесконтактной инкубации МСК и лимфоцитов (Рис. 7А.), а также снижению

уровня кинуренина в супернатантах от контактной и бесконтактной инкубации (Рис. 7Б.). Помимо этого, мы обратили внимание, что при совместной инкубации МСК и лимфоцитов в присутствии 1-МТ, в МСК возрастает содержание IDO на уровне белка по сравнению с контролем при бесконтактной инкубации, что указывает на важность IDO для бесконтактных механизмов иммуносупрессии (Рис. 7В.).

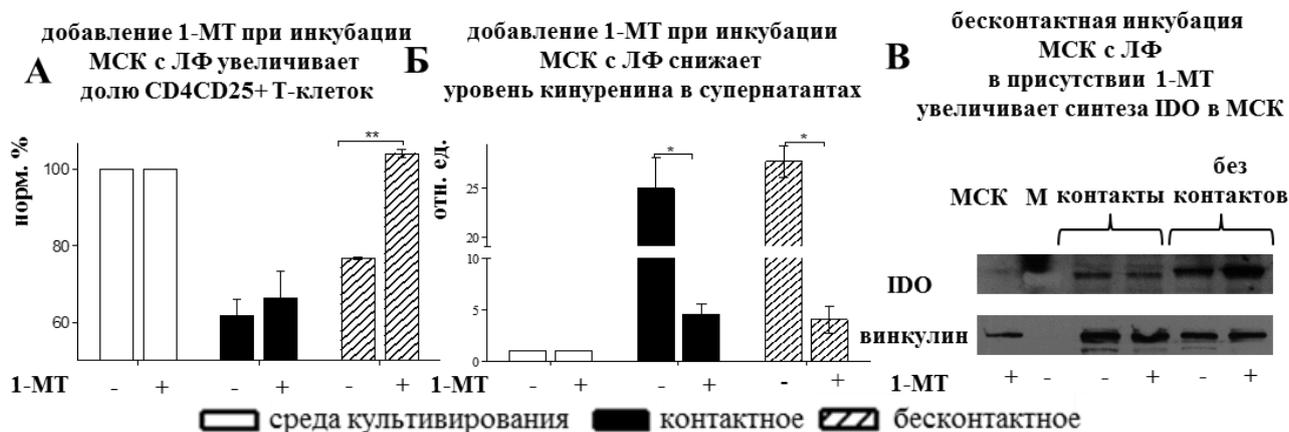


Рисунок 7. Анализ влияния IDO на иммуносупрессорную программу МСК (А) Оценка доли CD4CD25⁺ лимфоцитов после инкубации с МСК в присутствии ингибитора IDO. (Б) Уровень кинуренина, измеренный методом ИФА, в полученных супернатантах от совместной инкубации МСК и лимфоцитов. (В) Репрезентативные данные иммуноблоттинга с антителами к IDO тотальных лизатов МСК, полученных после инкубации с лимфоцитами в присутствии ингибитора. Все данные (кроме иммуноблоттинга) представлены в виде $M \pm SEM$, $N=3$ * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни) 1МТ - 1-метил-D,L-триптофан, М – маркеры.

Контактная инкубация приводит к увеличению транскрипционного и поверхностного уровней ICAM-1 в МСК

Мы обнаружили, что в контактных условиях МСК оказывают максимальное блокирующее действие на лимфоциты, по сравнению с контролем (лимфоциты без МСК) (Рис. 2, Рис. 4А.). На мышинных МСК было продемонстрировано, что молекулы адгезии могут играть важную роль в иммуносупрессии [Ren G. et al., 2011]. Однако, для человеческих МСК данный вопрос никто не изучал. В связи с этим, мы проанализировали в МСК изменение уровней мРНК генов молекул адгезии, которые потенциально могут принимать участие, по данным литературы, в иммуносупрессии, среди них: ICAM1, VCAM1, ряд селектинов и кадгеринов. Наши эксперименты показали, что в МСК при инкубации с лимфоцитами значительно возрастает уровень мРНК ICAM1. При этом повышение уровня мРНК ICAM1 в МСК наблюдали как после инкубации со стимулированными, так и не стимулированными Т-клетками (Рис. 8А.). Так как увеличение мРНК не всегда сопровождается увеличением синтеза белка, мы оценивали уровень ICAM-1 на поверхности МСК и также обнаружили его увеличение как в случае с активированными, так и не стимулированными лимфоцитами, однако при инкубации со стимулированными Т-клетками уровень ICAM-1 на МСК был выше (Рис. 8Б-В.). Таким образом, МСК реагируют на появление лимфоцитов увеличением поверхностного уровня ICAM-1.

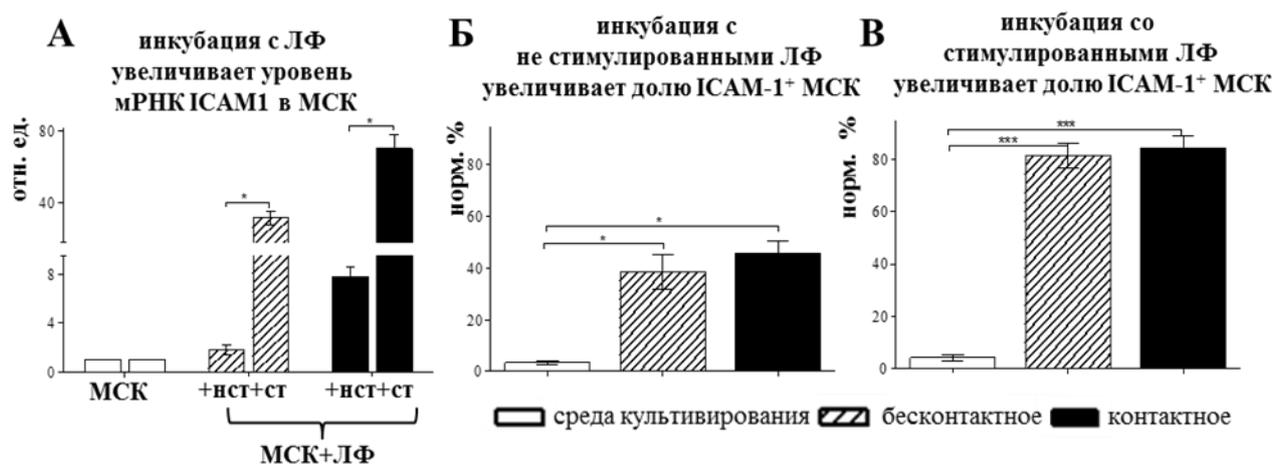


Рисунок 8. Увеличение транскрипции и количества ICAM-1 на поверхности МСК при инкубации с активированными и интактными лимфоцитами. (А) Усредненные данные изменения уровня мРНК ICAM1 в МСК после инкубации с ЛФ. (Б) и (В) Анализ доли ICAM-1⁺ МСК по сравнению с контролем, $M \pm SEM$, $N = 4$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). ICAM-1 молекула межклеточной адгезии 1 типа, нст – не стимулированные лимфоциты, ст – стимулированные лимфоциты.

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

Из литературы известно, что ICAM-1 принимает участие в активации лимфоцитов. В частности, было показано, что взаимодействие наивных Т-клеток с антителами против CD3 в комбинации с иммобилизованными молекулами ICAM-1, приводит к более сильной стимуляции Т-клеток. Предположили, что стимулирующий сигнал возникает за счет взаимодействий между ICAM-1 и LFA-1 (ассоциированный с функцией антиген лимфоцитов 1), однако блокировка LFA-1 не влияет на активацию лимфоцитов [Chen T. et al., 1999]. Мы предположили, что, возможно, ICAM-1 на МСК и на лимфоцитах может формировать гомодимеры ICAM-1/ICAM-1. И именно эти гомодимеры отвечают за негативный эффект в отношении активации лимфоцитов. Для проверки этого предположения мы анализировали уровень мРНК ICAM1, а также содержание белка в не стимулированных и стимулированных лимфоцитах. Оказалось, что в контактных условиях лимфоциты на появление МСК отвечают увеличением уровня мРНК ICAM1, при этом уровень мРНК ICAM1 в стимулированных лимфоцитах повышался сильнее, чем в не стимулированных (Рис. 9А.). В то же время МСК снижают долю ICAM-1⁺CD4 клеток среди активированных CD4 Т-клеток и повышают ее у интактных, причем максимальный эффект достигается при наличии контактов между МСК и лимфоцитами (Рис. 9Б-В.).

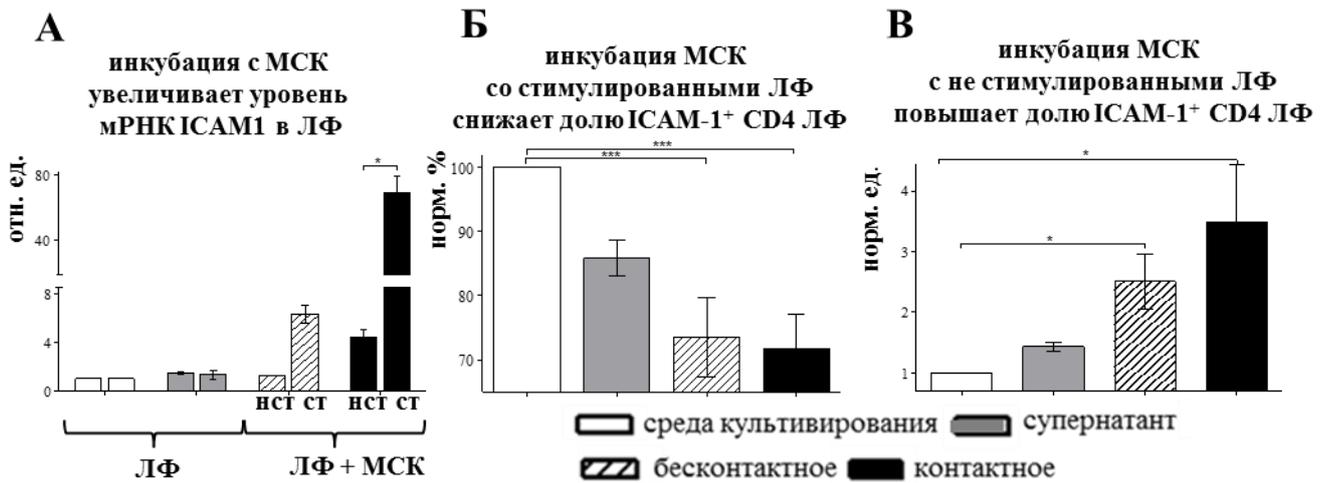


Рисунок 9. Изменение мРНК и поверхностного уровней ICAM-1 в активированных и интактных лимфоцитах при совместной инкубации с МСК (А). Изменение уровня экспрессии гена ICAM1 в лимфоцитах, N=4. Доля ICAM-1+ клеток среди стимулированных (Б) и не стимулированных (В) CD4 лимфоцитов, N=6.

Уровень мРНК ICAM1 в МСК и лимфоцитах возрастает под действием супернатанта после совместной инкубации МСК и лимфоцитов

В экспериментах по измерению уровня мРНК ICAM1 в МСК и лимфоцитах мы наблюдали эффекты не только при контактной, но и бесконтактной инкубации. Это предполагает, что для индукции увеличения мРНК ICAM1 в МСК и лимфоцитах участвуют растворимые факторы, продуцируемые МСК и лимфоцитами при совместной инкубации. Мы добавили супернатанты от совместной инкубации МСК и активированных лимфоцитов к не стимулированным МСК и лимфоцитам и оценивали уровень мРНК ICAM1 в обоих типах клеток через 48 часов. Добавление супернатантов, полученных после контактной и бесконтактной инкубации МСК и лимфоцитов, приводило к повышению уровня мРНК ICAM1 и в лимфоцитах, и в МСК. При этом добавление супернатанта, полученного в условиях контактных взаимодействий МСК-ЛФ, вызывает максимальное увеличение уровня мРНК ICAM1 в обоих типах клеток по сравнению с контролем (лимфоциты и МСК, инкубируемые отдельно) (Рис. 10.).

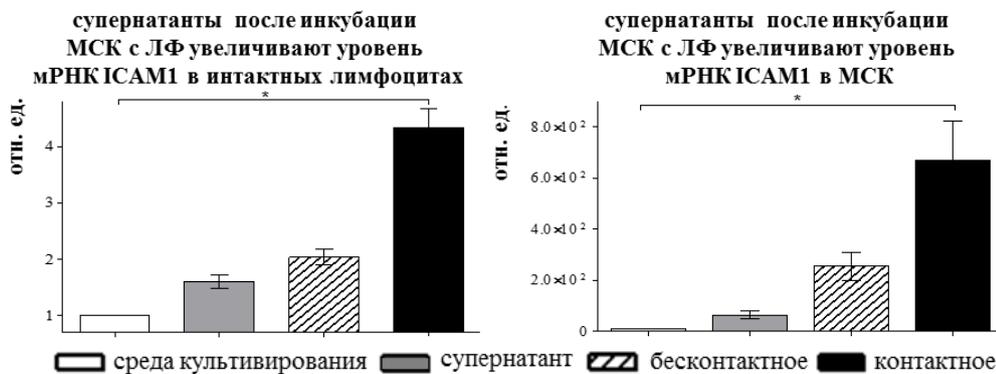


Рисунок 10. Изменения уровней мРНК ICAM-1 в МСК и интактных ЛФ при добавлении супернатантов от иммуносупрессии. $M \pm SEM$, N=3 (* $p < 0,05$).

Блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов повышает долю CD4CD25⁺ Т-клеток, но не приводит к снижению уровня IDO в МСК

Мы установили, что образование контактов между МСК и активированными лимфоцитами негативно влияет на уровень ICAM-1 на поверхности активированных Т-клеток (Рис. 9Б.). Это коррелирует со снижением доли CD4CD25⁺ Т-лимфоцитов при контактной инкубации с МСК (Рис. 4.) Вероятно, ICAM-1 на поверхности МСК за счет ICAM-1/ICAM-1 взаимодействий способен передавать внутрь Т-клетки сигнал, который негативно влияет на активацию и пролиферацию Т-клеток. Чтобы подтвердить наше предположение мы использовали специфические антитела к ICAM-1, чтобы заблокировать ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов. Моноклональные антитела SC-107L (SantaCruz, США), согласно литературе [Treadwell M.D. et al., 1996], препятствуют связыванию этой молекулы с лигандами. Блокировка ICAM-1 на поверхности клеток (Рис. 11.) при контактной инкубации МСК и активированных очищенных CD4 лимфоцитов приводила к значительному увеличению доли CD4CD25⁺ лимфоцитов, что говорит о снижении иммуносупрессорного действия МСК (Рис. 11А., Рис. 12). При этом в условиях блокировки ICAM-1 в смешанной культуре МСК и Т-хелперов полного восстановления доли CD4CD25⁺ лимфоцитов по сравнению с контролем не происходит (Рис. 11А.). Наблюдаемый эффект, возможно, связан с бесконтактными механизмами иммуносупрессии, реализуемыми через IDO, которые необходимо блокировать для полного устранения эффекта. Чтобы оценить активность IDO мы детектировали уровень кинуренина в супернатантах от смешанных контактных культур МСК и Т-хелперов в присутствии блокирующих антител к ICAM-1, а также проанализировали содержание белка IDO в лизатах МСК, от полученных культур. По нашим данным, блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и Т-хелперов не влияет на содержание кинуренина в супернатантах и не влияет на уровень белка IDO в МСК (Рис. 11Б-В.). Полученный результат позволяет нам предположить, что контактные и бесконтактные механизмы иммуносупрессии действуют независимо друг от друга. Таким образом, наши данные согласуются с результатами, полученными на мышинных МСК [Ren G. et al., 2008].

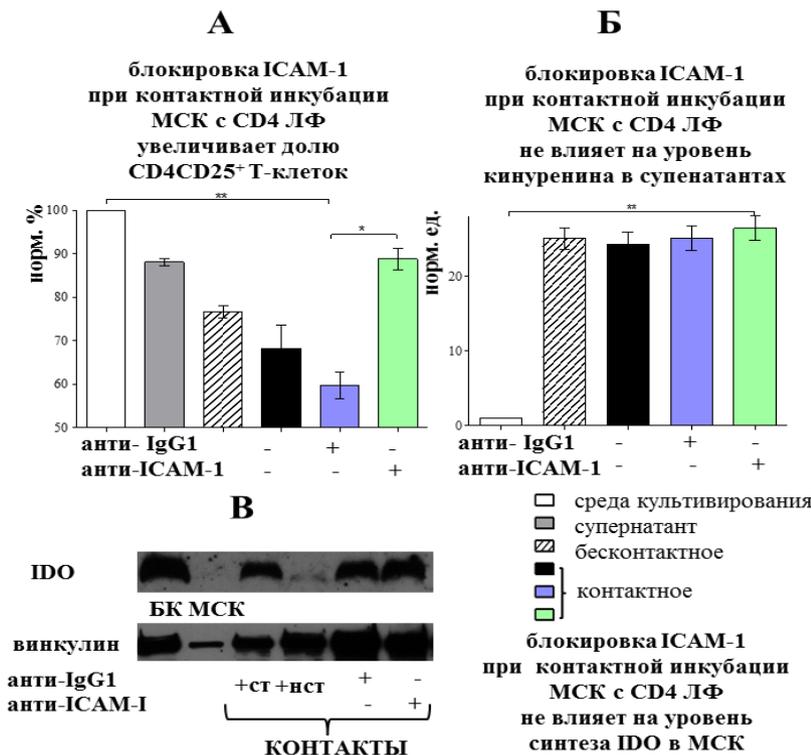


Рисунок 11. Влияние блокировки ICAM-1 на поверхности клеток при совместной инкубации МСК и активированных CD4 Т-клеток на иммуносупрессию (А) Доля CD4CD25⁺ лимфоцитов среди CD4 Т-клеток; $M \pm SEM$. (Б) – Уровень кинуренина в супернатантах после инкубации, $N=6$. (В) - Данные иммуноблоттинга, регистрирующего люминесценцию антител против IDO в тотальных лизатах МСК, полученных от инкубации с Т-хелперами в присутствии блокирующих антител против ICAM-1 (IgG1), в качестве контроля использовали антитела против мышиного IgG1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. БК-бесконтактное культивирование, ст – стимулированные, нст – не стимулированные.

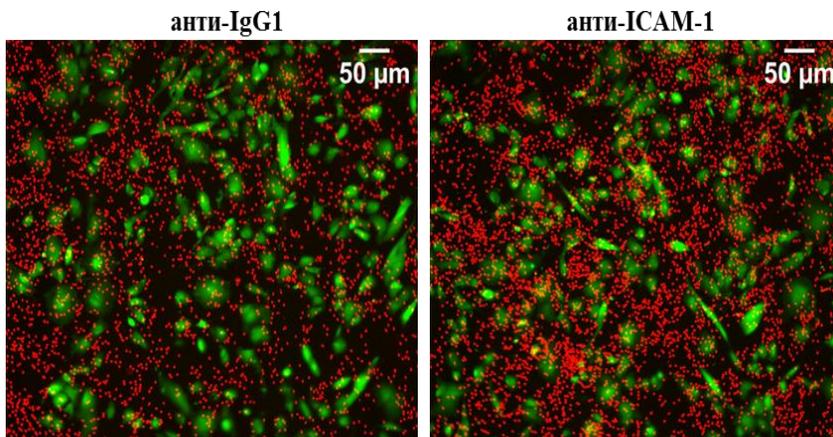


Рисунок 12. Блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов снижает иммуносупрессорную активность МСК. Микрофотографии (флуоресценция, 10x увеличение) контактной инкубации МСК и ЛФ через 48 ч в присутствии изотипического контроля и блокирующих антител на ICAM-1 МСК - CellTrace™ Calcein Green, AM, лимфоциты - CellTrace™ Calcein Red-Orange, AM.

МСК способствуют увеличению уровня CD25 на интактных Т-хелперах

Установлено, что МСК способствуют выживанию клеток иммунной системы, в частности лимфоцитов, в определенных условиях, например, введение МСК мышам с аутоиммунной патологией в присутствии иммунодепрессантов не только не усиливало иммуносупрессорный эффект, а наоборот приводило к увеличению активности клеток иммунной системы [Inoue S. et al., 2006]. Изучая влияние МСК на очищенную популяцию интактных CD4 Т-клеток (Рис. 13.), мы обнаружили, что через 48 часов в популяции Т-хелперов увеличиваются доля и число клеток, несущих на своей поверхности CD25 (Рис. 14.).

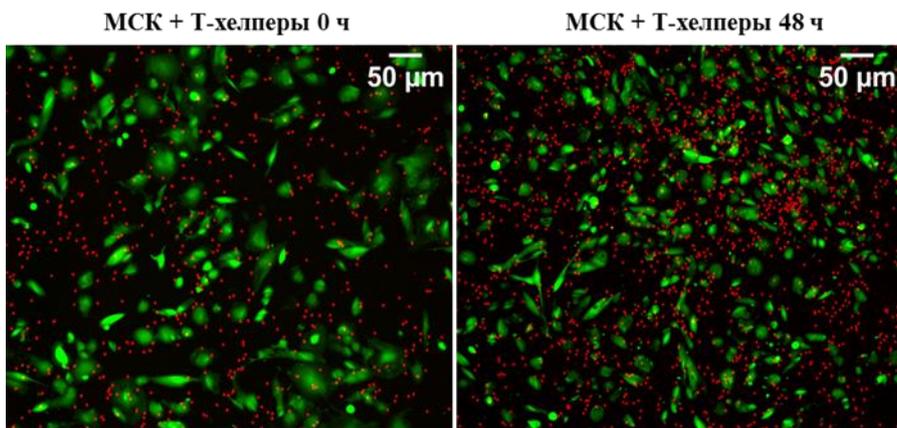


Рисунок 13. Контактная инкубация МСК и интактных Т-хелперов способствует выживанию лимфоцитов. Микрофотографии (флуоресценция, 10х увеличение) интактных Т-хелперов в контактном взаимодействии с МСК в начале и через 48 ч совместной инкубации.

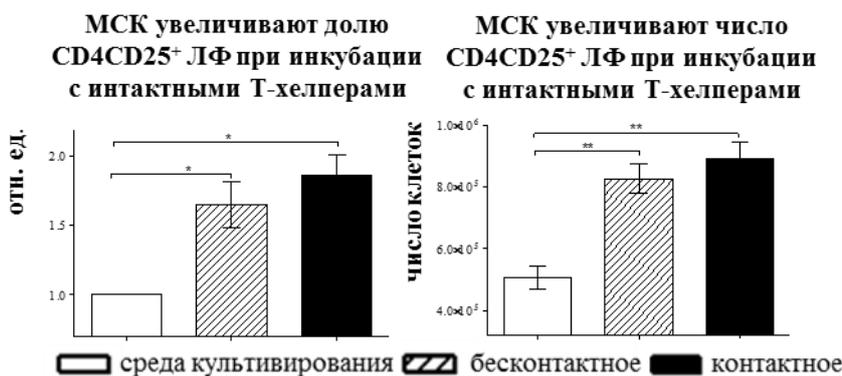


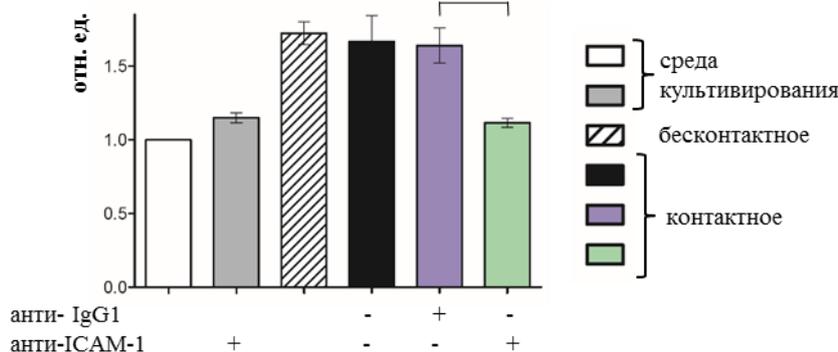
Рисунок 14. Инкубация интактных Т-хелперов с МСК способствует их выживанию. Доля и число интактных Т-хелперов, несущих CD25, после инкубации с МСК. $M \pm SEM$, $N=5$ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Наши данные по увеличению доли и числа CD4CD25⁺ лимфоцитов после инкубации с МСК в отсутствие стимуляции подтверждают гипотезу, что основная задача МСК в ткани не полная блокировка активности клеток иммунной системы, что приводило бы к опасному для организма иммунодефициту, а участие в регуляторных механизмах контроля над их функционированием [Bernardo M.E. et al., 2013].

ICAM-1 на поверхности МСК способствует выживанию лимфоцитов в отсутствие стимуляции

Инкубация МСК с интактными лимфоцитами, по нашим данным, способствует выживанию Т-клеток. Мы обратили внимание на корреляцию в увеличении поверхностных уровней ICAM-1 и CD25 на интактных CD4 лимфоцитах (Рис. 9В, Рис. 14.) При этом уровень ICAM-1 возрастал и на самих МСК при инкубации с не стимулированными лимфоцитами (Рис. 8Б.) / интактными CD4 Т-хелперами (данные не представлены), по сравнению с контролем (МСК, инкубируемые отдельно). Было предположено, что ICAM-1/ICAM-1 взаимодействия между МСК и лимфоцитами могут играть роль не только в иммуносупрессии, но и в поддержании выживания лимфоцитов. Для проверки гипотезы мы добавили блокирующие антитела на ICAM-1 к смешанным контактными культурам МСК и очищенных интактных CD4 Т-хелперов и затем анализировали долю CD4CD25⁺ лимфоцитов. Мы установили, что блокировка ICAM-1 на поверхности МСК и Т-хелперов, снижала долю CD4CD25⁺ лимфоцитов до контрольных значений (интактные Т-лимфоциты, инкубируемые отдельно). Таким образом, мы можем предположить, что ICAM-1/ICAM-1 взаимодействия между МСК и лимфоцитами также участвуют в поддержании выживания Т-клеток (Рис. 15.)

**блокировка ICAM-1 при контактной инкубации
МСК с интактными CD4 ЛФ
снижает долю CD4CD25⁺ Т-клеток**



*Рисунок 15. Блокирование ICAM-1 на поверхности МСК и интактных лимфоцитов при совместной инкубации отменяет способность МСК повышать уровень CD25 на поверхности Т-клеток. Доля CD4CD25⁺ клеток от CD4 лимфоцитов. M ± SEM, N=4, * p<0,05).*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена взаимодействию МСК и Т-лимфоцитов человека. Мы показали, что реализуемая МСК иммунорегуляторная программа гибкая и, в зависимости от микроокружения, способна ингибировать активацию или, наоборот, поддерживать выживание Т-клеток (Рис. 4, Рис. 14). При этом молекула межклеточной адгезии ICAM-1 возможно играет функцию переключателя между иммуносупрессией и стимуляцией интактных Т-клеток (Рис. 11, Рис. 15). Мы полагаем, что наши наблюдения помогут в расшифровке механизмов действия МСК в ряде патологий, таких как ревматоидный артрит, реакция трансплантата против хозяина и некоторых других. На Рис. 16 представлено графическое заключение нашей работы.

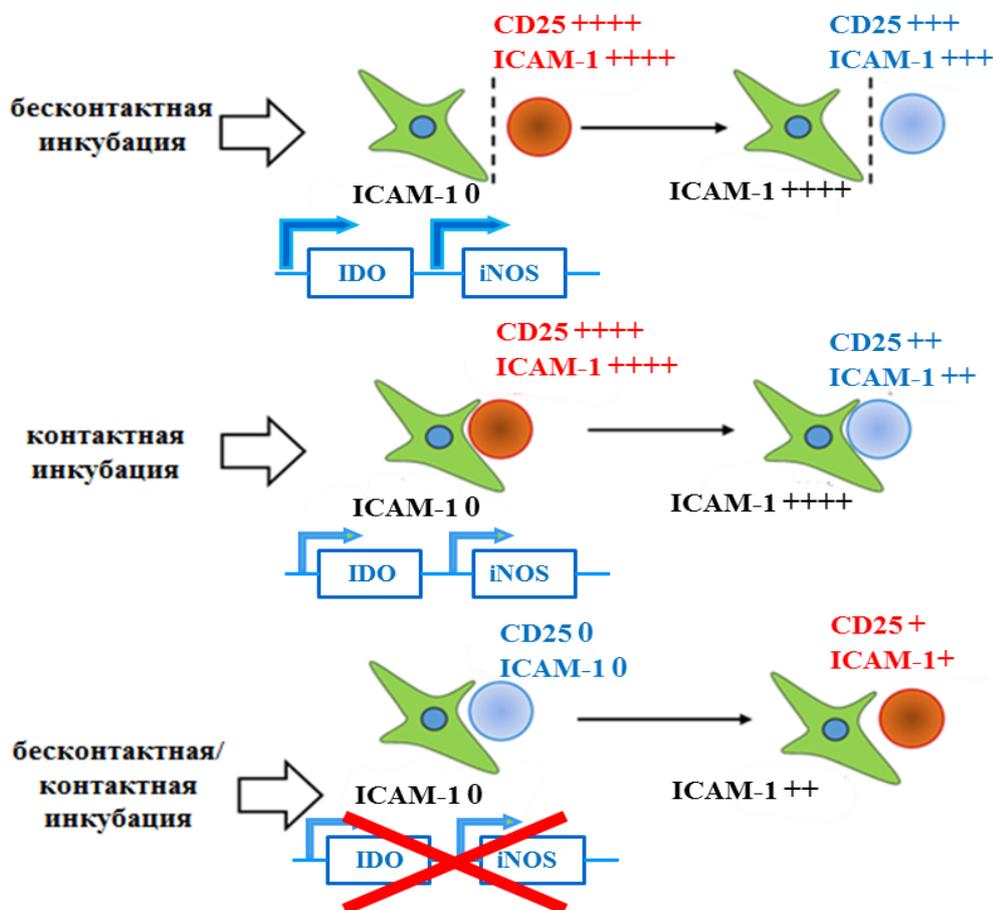


Рисунок 16. Обнаруженные молекулярные регуляторные механизмы действия МСК на Т-лимфоциты человека. ++++ - уровень синтеза до начала совместной инкубации МСК и лимфоцитов, +++ уровень синтеза после бесконтактной инкубации МСК и лимфоцитов, ++ уровень синтеза после контактной инкубации МСК и лимфоцитов, + уровень синтеза в условиях поддержания выживания лимфоцитов МСК, 0 - отсутствие синтеза.

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА – иммуноферментный анализ
ЛПК – лейкоциты периферической крови
мРНК – матричная РНК
МСК – мезенхимные стромальные клетки
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ФГА - фитогемагглютинин
1-МТ - 1-метил –D,L–триптофан
CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки
Fas - apoptosis antigen 1, антиген апоптоза 1
FasL - Fas ligand, лиганд Fas
HLA-DR - МНС class II, главный комплекс гистосовместимости II типа
ICAM-1 - intercellular adhesion molecule 1, молекула межклеточной адгезии 1
IDO - indoleamine 2,3-dioxygenase, индоламин-2,3-диоксигеназа
IFN- γ - interferon gamma, интерферон γ
iNOS - inducible nitric oxide synthase, индуцируемая NO-синтаза
LFA-1 - lymphocyte function-associated antigen 1, функционально ассоциированный антиген лимфоцитов 1
L-NMMA - N^G-монометил-L- аргинина
М – среднее значение
NO – оксид азота II
NOS2 – ген, кодирующий iNOS
PD-1 - programmed cell death 1 - рецептор программируемой клеточной гибели 1
PD-L1 –PD-1 ligand, лиганд PD-1
PGE2 - prostaglandin E2, простагландин E2
PTGS2 – ген, кодирующий PGE2
SEM – стандартная ошибка среднего
TNF- α - tumor necrosis factor α , фактор некроза опухоли α
TSG-6 - tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein, белок, стимулированного TNF- α гена 6
TGF β – ген, кодирующий фактор роста опухоли β
VCAM-1 - vascular cellular adhesion molecule 1, васкулярная молекула клеточной адгезии 1

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в Перечень РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук:

1. Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells / Rubtsov Y.P., Suzdaltseva Y.G., **Goryunov K.V.**, Kalinina N.I., Sysoeva V.Y., Tkachuk V.A. // *Acta Naturae*. – 2012. – Vol. 4. – P. 23-31.
2. Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1 / Rubtsov Y, **Goryunov K**, Romanov A, Suzdaltseva Y, Sharonov G, Tkachuk V. // *Stem Cells Int.* - 2017; 6516854. doi: 10.1155/2017/6516854.
3. Suzdaltseva Y.G. The role of intercellular contacts in induction of indolamine-2,3-dioxygenase synthesis in MMSC from adipose tissue / Suzdaltseva Y.G., **Goryunov K.V.**, Rubtsov Y.P. / *Cell and Tissue Biology*. - 2018. - Vol. 12. - № 5. - P. 391–401.

Другие публикации

4. Воротников А.В., Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Аниол Н.В., **Горюнов К.В.**, Кудряшова Т.В., Тюрин-Кузьмин П.А., Ткачук В.А. Направленная миграция и мезенхимальные прогениторные клетки: участие в воспалении, репарации и регенерации ткани: сборник статей - Стволовые клетки и регенеративная медицина / ред. Проф. В.А Ткачука.- Москва: Макс-пресс, 2012. - 57–91 с.
5. Suzdaltseva Yulia, **Goryunov Kirill**, Rubtsov Yuri, Tkachuk Vsevolod. Differential involvement of IFN-GAMMA and TNF-ALPHA IN IMMUNOSUPPRESSION MEDIATED BY HUMAN ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS // ISSCR 10th Annual Meeting: Poster Session Abstracts (Yokogama, Japan, June 13-16 2012) - Yokohama, 2012. – Vol. 2. - P 178.
6. **Горюнов К.В.**, Романов А.Ю., Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Ткачук В.А. Молекулярные механизмы, отвечающие за переход мезенхимных стромальных клеток человека из иммуностимулирующего в иммуносуппрессирующее состояние // Научные труды IV съезда физиологов СНГ (Россия, Дагомыс 8-12 октября, 2014г.). Москва, 2014. - С. 149.
7. Романов А.Ю., **Горюнов К.В.**, Суздальцева Ю.Г., Рубцов Ю.П., Ткачук В.А. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИИ МСК in vitro // 2-й Национальный Конгресс по регенеративной медицине (Россия, Москва 3–5 декабря, 2015г). - Москва, 2015. - С. 157-158.
8. Рубцов Ю.П., **Горюнов К.В.**, Романов А.Ю., Суздальцева Ю.Г., Шаронов Г.В., Ткачук В.А. Молекулярные механизмы иммуномодуляции мезенхимными стромальными клетками: важная роль ICAM-1 // «аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания». Тезисы конференции (Россия, Москва 8-10 декабря 2016г). Москва, 2016. - Т.54. - С. 48-48.
9. Suzdaltceva, J.; Gabashvili, A.; **Goryunov, K.**, Rubtcov Y., Tkachuck V. Immunosuppression mediated by mesenchymal stem cells involves cell-cell contact mechanism // The 43rd FEBS congress (Prague, Czech Republic, 7-12 July 2018). Wiley, 2018. – Vol.8. - № S1. – P. 148.