

Паракринные механизмы противовоспалительного и органопротективного действия при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Обзор литературы

М.Ш. Хубутия¹, В.А. Вагабов², А.А. Темнов¹, А.Н. Склифас²

¹НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва,

²ИБК РАН, Пущино

Контакты: А.А. Темнов, aa-temnov@yandex.ru

Обобщены и систематизированы многие исследования и наблюдения о паракринных факторах, выделяемых стволовыми клетками, и об их биологической функции. Дана краткая характеристика основных групп цитокинов.

Ключевые слова: стволовые клетки, цитокины, паракринный эффект.

Paracrine mechanisms of antiinflammatory and organoprotective effects in MSC transplantation

M.Sh. Khubutiya¹, V.A. Vagabov², A.A. Temnov¹, A.N. Sklifas²

¹Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow

²Institute of cell biophysics, Puschino

The purpose of this review was to systematize data of many studies and observations of paracrine factors of MSC and their biological effects. Also a brief description of main groups of cytokines was revealed in the review.

Key words: stem cell, cytokines, paracrine effect.

Введение

На сегодняшний день как в практической, так и в фундаментальной медицине остро стоит вопрос терапии состояний, характеризующихся развитием системного воспалительного синдрома и острых органных поражений. Такие состояния, как множественная и сочетанная травма, сепсис, распространенные ожоги, стоят на 5-м месте среди заболеваний, приводящих к летальному исходу во всех возрастных группах, немногим уступая сердечно-сосудистым, онкологическим и различным хроническим заболеваниям [3]. Помимо гиперэргического воспалительного синдрома, развивающегося как ответ на повреждение тканей, данные состояния зачастую приводят к полиорганной недостаточности, в особенности к острой почечной и печеночной патологии, острому респираторному дистресс-синдрому,

острому отеку легких, острой сердечной недостаточности. На сегодня более чем у трети стационарных больных (из них более чем у половины больных в АРО и более чем у 80 % больных в послеоперационном периоде) в той или иной степени наблюдаются симптомы системной воспалительной реакции [4].

Исходя из вышесказанного, учеными во всем мире ведутся активные работы по разработке методов для регуляции и контроля воспалительной реакции, купирования острой полиорганной недостаточности.

Все больше появляется работ по использованию мезенхимальных стволовых клеток (Mesenchymal stem cells, MCS) в данной области медицины. Многие работы подтверждают эффективность использования этих клеток как в экспериментальных моделях, так и в клинической практике при лечении состояний, спрово-

ждающихся признаками системного воспаления и острой органной недостаточности. Более того, все большее внимание акцентируется на факторах, выделяемых мезенхимальными стволовыми клетками в окружающую их среду, таким образом, говоря об их паракринной функции. Было четко показано, что использование кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток для лечения острых патологических состояний в экспериментах по своей эффективности практически не уступает использованию собственно стволовых клеток [9, 12], что говорит о неотъемлемом участии паракринных факторов в купировании патологического процесса. На сегодняшний день известно, что данные паракринные факторы представляют собой различные группы цитокинов, обладающих выраженными провоспалительными, антиапоптотическими, прогенеративными свойствами. Более того, появляется все больше информации, что стволовые клетки способны реагировать на экзогенные воздействия и, в зависимости от этого, модулировать синтез определенных цитокинов.

В различных работах авторы акцентируют свое внимание на функции того или иного цитокина. Цель данной работы: обобщить и систематизировать данные множества исследований и наблюдений о паракринных факторах, выделяемых мезенхимальными стволовыми клетками, и их биологической функции.

Однако сначала хотелось бы предоставить краткий обзор об общих свойствах и функциях цитокинов.

Цитокины (термин введен *Cohen S.* в 1974 г.) представляют собой белковые молекулы (массой 8–80 кДа, большинство из них содержат 4-альфа-спирали, некоторые (TNF, IL-1) – бета-складчатый слой), которые являются медиаторами межклеточных коммуникаций при иммунном ответе, гемопоэзе и развитии воспаления, эффекторами некоторых реакций иммунитета и служат связующим звеном между иммунной и другими системами организма [1]. Первые цитокины были открыты в конце 1950-х гг., к ним относятся противовирусные агенты-интерфероны, а также макрофагингибирующий фактор (MIF). Сегодня известно более 250 различных цитокинов [40]. Однако, несмотря на такое разнообразие, можно выделить свойства, характерные для всех цитокинов: 1) цитокины действуют в низких концентрациях; 2) цитокины, в основном, короткодистантные молекулы, действующие обычно локально (т.е. обладающие ауто- и/или паракрин-

ным эффектом); однако при массивном синтезе таких молекул, как TNF, IL-1, 6 и других, возможно появление и отдаленного (эндокринного) эффекта, проявляющегося, например, в воспалительной реакции; 3) плеiotропность – способность одного и того же цитокина действовать на разные клетки-мишени; 4) избыточность – один и тот же цитокин может вырабатываться различными клетками-продуцентами; 5) принято выделять так называемую цитокиновую сеть, в которой может наблюдаться синергизм (IL-13 и IL-4 действуют на В-лимфоциты и усиливают выработку IgE) либо антагонизм (IL-4 и IFN-гамма); 6) характерна каскадность (выработка одного цитокина запускает продукцию других); 7) индуцибельность – к выработке цитокинов может приводить активация клеток-продуцентов внешним агентом [1, 2].

Традиционная *классификация цитокинов* на интерлейкины, интерфероны, факторы некроза опухолей, колониестимулирующие факторы, хемокины и другие цитокины (трансформирующий фактор роста-бета, факторы роста) воспринимается сегодня весьма условной, так как не отражает реального разделения этих веществ по биологическому эффекту.

По биологическому действию цитокины можно разделить на: 1) посреднические в реакциях естественного иммунитета (IL-1, IL-6, TNF-альфа, хемокины). Основные мишени для этих факторов – макрофаги и гранулоциты; 2) регулирующие иммунные реакции (IL-2, 4, 12, трансформирующие фактор роста-бета; активацию, пролиферацию и дифференцировку зрелых лимфоцитов и др.); 3) регулирующие иммуноопосредованное воспаление (IFN-гамма, IL-10, IL-5, MIF и др.); 4) цитокины, регулирующие гемопоэз (колониестимулирующие факторы, ростовые факторы) [1, 2, 41].

Клетки-продуценты. Многими авторами выделяются три относительно автономные группы клеток-продуцентов цитокинов: лимфоциты, клетки моноцитарно-макрофагального ряда, стромальные соединительнотканые клетки (табл. 1). Мезенхимальные стволовые клетки сегодня также безоговорочно можно причислить к ряду клеток-продуцентов цитокинов. О продуцируемых ими факторах будет сказано ниже.

Индукция выработки клетками-продуцентами цитокинов может происходить под влиянием различных факторов, однако особого внимания заслуживает семейство Toll-подобных рецепторов (TLR-1-13), расположенных преимущественно на клетках моноцитарно-макрофагального

Таблица 1. Основные типы клеток-продуцентов цитокинов (по Ярилину А.А.)

Тип клеток	Индуктор цитокинов	Продуцируемые цитокины
Th1	Связывание антигена/митогена TCR-CD3/CD28+ИЛ-12	IFN-гамма, IL-2, TNF-альфа и бета, IL-3, GM-CSF, хемокины
Th2	Связывание антигена/митогена+ИЛ-4	IL-5,4,6,9,13,3,10, GM-CSF, хемокины
Макрофаги/моноциты	Бактерии, их продукты, форболовые эфиры, полиэлектролиты	IL-1,6,10,15,12, TNF-альфа, TGF-бета, IFN-альфа, хемокины, G-CSF, GM-CSF, M-CSF
Стромальные клетки (фибробласты, эндотелий, эпителиальные клетки)	Контактные взаимодействия, бактериальные продукты	G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-1, 6, 7, 8, 11, IFN-бета, TGF-бета

ряда, в меньшей степени на дендритных клетках, В-лимфоцитах, клетках печени, почек. Для этих рецепторов лигандом являются структурные компоненты бактерий, грибов, вирусов. Активация поверхностных TLR (TLR 1, 2, 4, 6) запускает их связывание со специфическими адаптерными белками (TICAM-1, MyD88, TIRAP и др.) и, в конечном счете, приводит к экспрессии транскрипционного фактора NFκB. В цитоплазме клетки NFκB находится в неактивном состоянии в комплексе с ингибиторным белком IκB. Стимуляция TLR лигандом ведет к фосфорилированию IκB под действием киназы IKK (IκB-киназа), а в дальнейшем к деградации IκB в результате действия протеосомы 26S. При этом NFκB высвобождается от ингибирующего комплекса, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию контролируемых генов, в итоге выделяются провоспалительные цитокины (IL-1, 6, TNF) к началу воспалительной реакции. Активация внутриклеточных TLR (TLR 3, 7, 9) приводит, главным образом, к выработке IFN-гамма [1, 2, 41].

Неотъемлемой частью системы цитокинов являются цитокиновые рецепторы, которые в большинстве случаев представляют из себя мембранные гликопротеины I типа, состоя-

щие из одного трансмембранного домена, который может содержать несколько субъединиц. Сегодня считается, что после связывания цитокина с рецептором происходит внутриклеточная передача сигнала за счет агрегации субъединиц рецепторов, что запускает дальнейший нисходящий каскад сигнализации. Большое количество рецепторов проводят внутриклеточную сигнализацию через молекулы Янус-киназы (Jaks), фосфорилирование которых приводит к активации сигнальных белков, таких как Stats. Димеры этих белков связываются уже непосредственно с ДНК, влияя на дальнейшие процессы транскрипции. Помимо Stats существуют и другие пути внутриклеточной сигнализации, например через активацию Ras/MAP-киназы, что приводит к пролиферации клеток.

Таким образом, работая непосредственно с ДНК, цитокины способны модулировать экспрессию самых различных генов и, следовательно, синтез самых различных агентов. Поэтому любое нарушение баланса в цитокиновой сети, как недостаточность какого-либо цитокина, так и избыточное его выделение, может приводить к серьезным патологическим проявлениям (табл. 2).

Таблица 2. Основные биологические эффекты цитокинов

Цитокин	Биологическое действие
<i>Интерлейкины:</i> интерлейкин-1 (две фракции IL-1-альфа и IL-1-бета)	Иммунологическое действие: вовлечение Т-клеток в иммунный ответ, участие в контактном взаимодействии между Т-клетками и макрофагами, стимулирует пролиферацию активированных В-клеток, их дифференцировку в плазматические клетки, стимуляция антителообразования; гемопозитическое действие: стимуляция миелопоэза и ранних этапов эритропоэза; противовоспалительное действие: повышает подвижность нейтрофилов, является хемоаттрактантом для многих клеток воспаления, активирует клетки в очаге воспаления, индуцирует продукцию ими цитокинов, простагландинов, стимуляция фагоцитоза, вызывает дегрануляцию тучных клеток, генерацию супероксид-радикалов, увеличивает синтез белков острой фазы, является пирогеном и др.; медиатор взаимодействия между нервной и иммунной системой
интерлейкин-2 (IL-2)	Индукция пролиферации Т-лимфоцитов (необходим для перехода периода G1a в G1b); усиливает выработку ИФН-гамма Т-хелперами; фактор дифференцировки Т-киллеров, повышает синтез IgA,M.G; увеличивает цитотоксичность NK-клеток; усиливает генерацию активных форм кислорода макрофагами; подавляет эритропоэз и миелопоэз, повышает образование тромбоцитов и эозинофилов

Продолжение табл. 2.

Цитокин	Биологическое действие
интерлейкин-3 (IL-3)	Поддерживает пролиферацию стволовых клеток, проявляет свое действие, в основном при стрессе и иммунном ответе, сопровождающемся активацией Т-клеток, усиливает, в основном, экстрамедуллярный гемопоэз, фактор роста тучных клеток
интерлейкин-4 (IL-4)	Ростовой фактор В-лимфоцитов, усиливает выработку IgE и IgG1, фактор пролиферации Т-лимфоцитов (Т-киллеров в большей степени), способствует дифференцировке Th в Th2; противовоспалительный эффект: подавляет секрецию макрофагами ИЛ-1, 6, ФНО
интерлейкин-5 (IL-5)	Дифференцировка В-лимфоцитов, ростовой фактор эозинофилов
интерлейкин-6 (IL-6)	Противовоспалительный эффект, влияет на синтез белков острой фазы гепатоцитами; пролиферация и дифференцировка В-клеток, увеличение синтеза Ig всех классов, синергист ИЛ-3, ГМ-КСФ, М-КСФ
интерлейкин-7 (IL-7, лимфопоэтин)	Основной фактор роста В-клеток, увеличивает выживаемость предшественников Т-клеток
интерлейкин-8 (IL-8)	Хемоаттрактант и активатор нейтрофилов
интерлейкин-9 (IL-9)	Поддержание пролиферации активированных Т-хелперов, усиливает эритропоэз
интерлейкин-10 (IL-10)	Подавление синтеза цитокинов Th1 и макрофагов, в том числе и воспалительных цитокинов – мощный противовоспалительный эффект
интерлейкин-11 (IL-11)	Способствует развитию всех ростков кроветворения и стволовых клеток; противовоспалительный эффект
интерлейкин-12 (IL-12)	Связующее звено между макрофагами и лимфоцитами, повышает активность Th1, цитотоксических клеток
интерлейкин-13 (IL-13)	Усиливает активность и пролиферацию В-клеток и моноцитов
Факторы некроза опухолей: фактор некроза опухолей-альфа (TNF-альфа, кахексин)	Индукция апоптоза, генерация активных форм O ₂ в клеточной мембране, лизис опухолевых и инфицированных клеток, подавляет активность липопротеиновой липазы, влияет на все клетки воспаления и является их хемоаттрактантом, пироген, усиливает синтез белков острой фазы, угнетает кроветворение (но стимулирует подавленное), усиливает антителообразование
фактор некроза опухолей-бета (TNF-бета, лимфотоксин)	Те же эффекты, что и для ФНО-альфа, но менее выраженные, не приводит к системному воспалению и участвует в дифференцировке лимфоцитов
Интерфероны: интерфероны (IFN) I типа (альфа и бета)	Подавляют процессы транскрипции и трансляции вирусных геномов; противоопухолевое действие за счет подавления пролиферации опухолевых клеток и активации NK-клеток, Т-лимфоцитов, макрофагов; усиливает синтез ИЛ-1, 2 (хотя являются их биологическими антагонистами)
интерферон (IFN) II типа (гамма)	Стимулирует макрофаги, усиливает экспрессию молекул MHCII, усиливает синтез ИЛ-1, 12 (последний угнетает синтез ИФН-гамма), снижает секреторную активность Th2, таким образом, усиливает клеточный и гуморальный иммунитет, более слабый противовирусный и противоопухолевый эффект
Колонистимулирующие факторы: ГМ-КСФ (GM-CSF)	Поддерживает пролиферацию общих гранулоцитарно-макрофагальных предшественников, юных эритроцитов, эозинофильных и мегакариоцитарных предшественников, повышает синтез ИЛ-1
Г-КСФ (G-CSF)	Влияет на гранулоцитарный росток и активирует зрелые клетки этого ростка
М-КСФ (M-CSF)	Влияет на моноцитарно-макрофагальный росток и активирует зрелые клетки этого ростка
фактор стволовых клеток	Воздействует на пролиферацию стволовых клеток
Хемокины	Вызывают направленное движение лейкоцитов, известно более 50, классифицируются по количеству цистеиновых остатков (С-хемокины, СС-хемокины, С-Х-С-хемокины, СХЗС1)
Факторы роста: трансформирующий В (TGF-В)	Подавляет синтез воспалительных цитокинов, гемопоэз, формирование цитотоксических NK- и Т-клеток; переключает синтез с IgG на IgA, способствует заживлению ран
гепатоцитов (HGF)	Принимает участие в органогенезе и тканевой репарации, обладает способностью стимулировать формирование сосудов и клеточную пролиферацию; стимулирует гемопоэз
эндотелия сосудов (VEGF)	Стимулирует ангиогенез непосредственно и опосредованно через другие цитокины), стимулирует проницаемость мелких кровеносных сосудов, препятствует апоптозу эндотелия
кератиноцитов (KGF)	Способствует эпителизации и заживлению ран
фибробластов (FGF)	Способствует ангиогенезу и заживлению ран, нейрогенезу, пролиферации эндотелия

Протективные свойства паракринных факторов, выделяемых стволовыми клетками.

Существует достаточно много работ, описывающих положительный эффект трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при самой различной патологии: острой почечной, печеночной, легочной патологии, инфаркте миокарда, поражении спинного мозга, рассеянном склерозе [4, 6–9]. Данные получены *in vitro*, *in vivo*, а в некоторых случаях и в клинических испытаниях [42, 43] и заключались в увеличении выживаемости особей (до 80 %) [5] и сохранении функции поврежденного органа (что подтверждали лабораторные и гистологические исследования) [4–6, 8–10]. И лишь в последние годы многие ученые стали акцентировать свое внимание на паракринной функции стволовых клеток, предавая ей все большее значение в наблюдаемом при пересадки MSC положительном эффекте.

Этот вывод можно было сделать на основании данных, полученных при использовании кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток (MSC-CM) без пересадки самих клеток (MSC).

Так, Eliopoulos и соавт. показали на модели острой почечной недостаточности (рис. 1), индуцированной цисплатином, что использование MSC-CM значительно повышает выживаемость клеток *in vitro* [9]. [12].

Кроме того, Lee, Fung, Navee и др. показали на модели острого отека легких и острой легочной недостаточности, вызванных введением липополисахарида *E. coli* (ЛПС), что использование кондиционированной среды для лечения данной патологии дает выраженный положительный эффект, лишь незначительно уступая эффекту при трансплантации самих MSC [8].

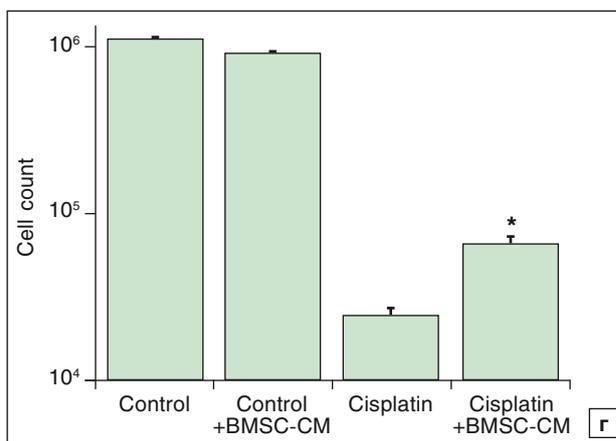


Рис. 1. Микроскопическое исследование культуры клеток проксимальных канальцев мыши через 24 ч после добавления 5 мг/мл цисплатина
 а – контроль; б – цисплатин; в – цисплатин+BMSC-CM; г – количество клеток в культуре, обработанной цисплатином с или без внесения мезенхимальных клеток костного мозга по сравнению с контролем (по Vi и др. [12])

Эти и многие подобные работы привели к тому, что сегодня весьма детально проводятся исследования паракринных факторов, выделяемых стволовыми клетками.

Обобщая результаты множества публикаций, можно условно выделить три основных эффекта, наблюдаемых как при введении самих мезенхимальных стволовых клеток, так и при использовании их кондиционированной среды: 1) прорегенераторный эффект, который связывают со способностью MSC в большом количестве продуцировать различные факторы роста, такие как HGF, VEGF, KGF, FGF и др.; 2) противовоспалительный эффект, связываемый с эффектом резкого снижения концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1, 6, макрофагальный воспалительный протеин (MIP)-2, G-CSF, TNF) при лечении MSC *in vitro* и *in vivo*; 3) антиапоптотический эффект в большинстве случаев связывают с повышением активности Р-Акт.

Прорегенераторный эффект. Повышенная экспрессия факторов роста неоднократно была зафиксирована во многих исследованиях. Кроме того, было показано, что экспрессия этих факторов индуцируется в ответ на повреждение.

Так, Morigi и др. в своей работе проводили совместное культивирование стволовых пуловинных клеток и клеток проксимальных почечных канальцев (НК-2), обработанных цисплатином, и выявили значительное повышение концентраций ростовых факторов, таких как FGF, HB-EGF, VEGF, HGF (в 2, 7, 5 и 12 раз соответственно), в ответ на повреждающее действие цисплатина [5].

На модели *in vivo* (мыши с цисплатин-индуцированной почечной недостаточностью) при введении пуловинных стволовых клеток также было выявлено выраженное повышение уровня HGF в сыворотке крови мышей на 4-е сут.

В работе, проведенной в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, было показано, что низкомолекулярные пептидные препараты, полученные из культивированных клеток костного мозга, резко повышают выживаемость экспериментальных животных с цисплатиновой моделью острой почечной недостаточности [45].

Схожие данные получили в своей работе канадские ученые, проведя анализ кондиционированной среды MSC и особенно отмечая повышенный в ней уровень факторов роста VEGF и HGF [9]. Используя моноклональные антитела,

они поочередно заблокировали действие каждого из этих цитокинов и обнаружили, что при этом положительный эффект от использования среды значительно падает. Причем в большей степени при блокировании VEGF.

Wu и др., изучая действие MSC на заживление ран, зафиксировали выраженный ангиогенез на модели *in vivo* при внесении MSC по сравнению с контрольной группой. Методом РТ-ПЦР они обнаружили повышенную экспрессию VEGF-альфа, с чем, в первую очередь, и связывают повышенную васкуляризацию и ангиогенез, что приводит к повышению регенерации ткани [13]. Кроме того, получены данные, что VEGF повышает пролиферацию как эндотелиальных, так и эпителиальных клеток [15, 16].

Также некоторые исследования показали, что секреция HGF и IGF-1 способствует снижению степени повреждения канальцевого эпителия у мышей при токсическом или реперфузионном повреждении почек [17, 18].

Немецкие ученые [7], изучая культуру MSC *in vitro*, при помощи РТ-ПЦР зафиксировали высокую экспрессию генов HGF, NGF, VEGF-альфа, BDNF, NT3, SDF1-альфа, а также обнаружили модуляцию их экспрессии в ответ на введение ЛПС. Так, они отмечают явное повышение экспрессии HGF, NGF и SDF1-альфа и снижение экспрессии VEGF-альфа, EGF, NT3, NT4, что, в некотором смысле, становится вразрез с данными вышеуказанных работ, придающих VEGF одно из ведущих значений в развитии прорегенераторного эффекта при использовании MSC и их кондиционированной среды. Однако немецкие ученые также отмечают и варьирование экспрессии различных генов в зависимости от донорской принадлежности клеток, чем отчасти можно объяснить расхождение данных.

В других работах ученые акцентируют свое внимание на факторе роста кератиноцитов (KGF) [8, 10]. Lee, Fang, Gupta изучали воздействие аллогенных MSC и MSC-СМ на модели острой легочной недостаточности, индуцированной ЛПС *E. coli*, *ex vivo*. Исследуя альвеолярную жидкость после инстилляций MSC и MSC-СМ, они обнаружили высокую концентрацию KGF по сравнению с контрольной группой. Более того, используя интерференцию РНК, они произвели «нокдаун» гена KGF, что привело к снижению синтеза KGF и, как результат, – к значительному падению показателя клиренса альвеолярной жидкости (AFC). Падение AFC означает нарастание отека легкого – одной из неотъемлемых

составляющих острой легочной недостаточности. При добавлении же рекомбинантного KGF к MSC-СМ с «выключенным» геном KGF протективный эффект сохранялся и показатель AFC восстанавливался. Такое действие KGF авторы связали с его способностью стимулировать работу гена альфа-эпителиальных натриевых каналов (альфа-ENaC), что приводит к увеличению их экспрессии на апикальной мембране легочного эпителия. Вследствие увеличения числа ионных каналов клиренс альвеолярной жидкости нормализуется, а отек легких уменьшается. Связь с ENaC подтверждает и то, что при внесении в модель амилорида (ингибитора ENaC) протективное действие MSC и MSC-СМ на AFC резко снижается [8].

Таким образом, сегодня представляется весьма вероятным, что факторы роста, выделяемые стволовыми клетками, являются важной составляющей протекционного действия стволовых клеток. Продуцируя вокруг себя среду с обили-

ем данных паракринных агентов, MSC создают хорошие условия для восстановления пролиферации клеток (что было показано при исследовании ядерного антигена пролиферирующих клеток PNCA [5, 12]) и регенерации поврежденной ткани.

Кроме того, считается, что некоторые факторы роста, например VEGF, способны активировать мощные факторы-ингибиторы клеточной гибели, такие как протеин-киназа-В (серин-треонинкиназа, Akt), с чем, в том числе, связывают антиапоптотический эффект MSC и MSC-СМ.

Антиапоптотическое действие MSC было неоднократно выявлено как при гистологическом исследовании с помощью применения окраски TUNEL, позволяющей обозначить клетки, подвергшиеся апоптозу. Такие исследования неоднократно проводились на тканях почек, печени, легких (рис. 2) [4, 6, 9, 12].

Также было проведено количественное определение Akt с помощью Westernblot и ПЦР-

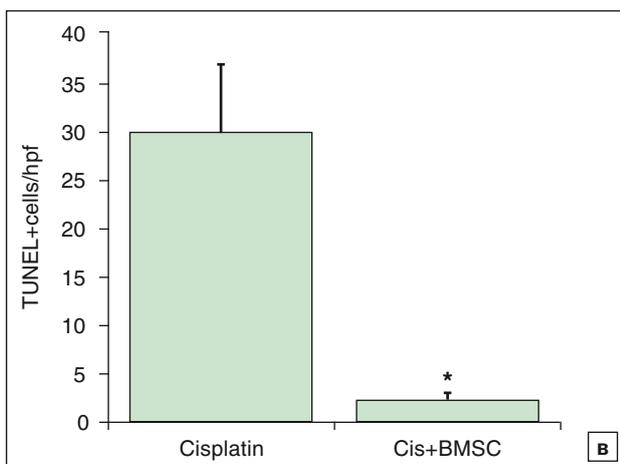
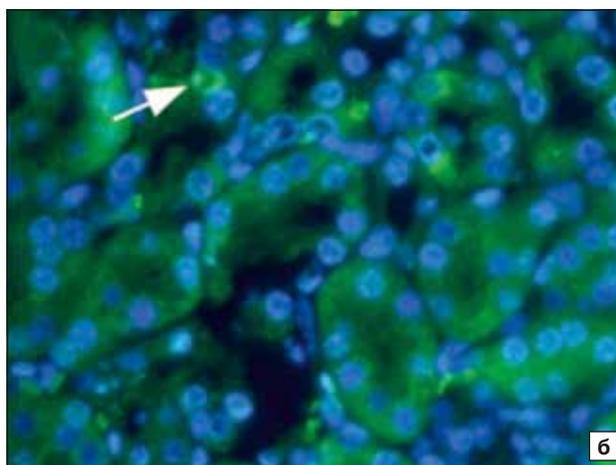
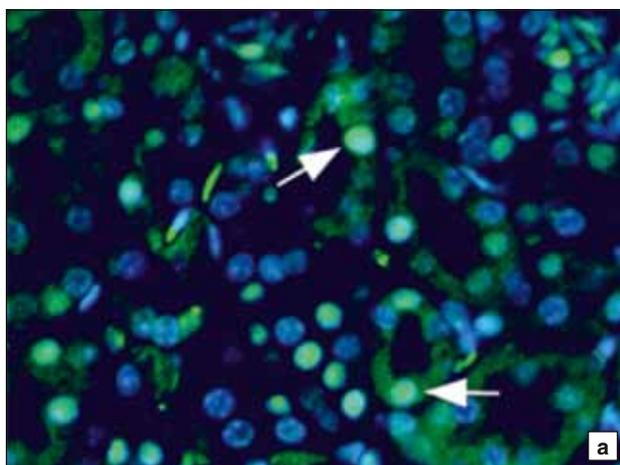


Рис. 2. Окраска TUNEL канальцевого эпителия почек на 2-й день после интраперитонеального введения 10 мг/кг цисплатина (а), та же культура клеток с добавлением мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (б) и количественное поредение апоптотических клеток (в) (по Vi и др.)

исследований, которое четко показало повышение уровня этого антиапоптотического агента как *in vitro*, так и *in vivo* при использовании MSC или их кондиционированной среды [5, 6, 9].

Антиапоптотический эффект Akt связан с его способностью фосфорилировать Bcl-ассоциированный промоутер клеточной гибели (BAD). BAD способен формировать поры во внешней мембране митохондрий, что ведет к выходу из митохондрий в цитоплазму цитохрома С и активации цитоплазматического каскада каспаз, приводящего к клеточной гибели. В фосфорилированном же виде BAD диссоциирует и теряет свои проапоптотические способности [44].

Помимо гистологического исследования и определения уровня Akt, в ряде работ [9] было проведено определение уровня экспрессии клетками каспазы-3 (как маркера апоптоза) и Ki-67 (как маркера пролиферации) (рис. 3). При этом отмечается явное снижение уровня каспазы-3 по сравнению с контролем при использовании MSC на модели цисплатин-индуцированной почечной недостаточности и повышение уровня Ki-67, что говорит о снижении апоптоза и повышении пролиферации клеток [19].

Тем не менее, антиапоптотическое действие MSC и MSC-СМ пока остается весьма малоизученной и дискутируемой темой. С одной стороны, имеются данные, что важнейшим механизмом апоптоза (в особенности, цисплатин-индуцированного) является действие активных форм кислорода [20]. Как возможный механизм антиапоптотического воздействия MSC можно рассмотреть способность ростовых факторов

предотвращать оксидативный стресс, нормализуя активность антиоксидантных ферментов и функцию митохондрий по расходу кислорода [21]. Так, было показано, что внесение HGF увеличивает выживаемость клеток при оксидативном стрессе на модели инфаркта миокарда [22].

С другой стороны, имеются данные, что факторы роста, такие как VEGF, способны активировать Akt [23]. Так, при введении анти-VEGF антител падает активность Akt *in vitro*, и возрастает степень апоптоза [9]. Также было показано, что MSC-СМ активирует действие Akt (через фосфатидил-инозитол-3-киназу) в первичном эндотелии аорты *in vitro* в условиях гипоксии, что снижает уровень апоптоза [24].

Таким образом, намечено большое поле для изучения антиапоптотического действия MSC, и роль в этом эффекте паракринных факторов, выделяемых этими клетками, по-видимому, весьма значительна.

Противовоспалительный эффект. На моделях острой легочной, почечной, печеночной недостаточности, индуцированной ЛПС, на моделях термического ожога, т.е. состояниях, сопровождающихся выраженным воспалительным синдромом, использование MSC неоднократно давало выраженный положительный эффект [4, 10, 11].

Однако многие вопросы относительно ведущего звена в противовоспалительном эффекте, вызванном MSC, остаются спорными.

Одним из важнейших провоспалительных цитокинов является TNF. Имеются данные, свидетельствующие, что использование MSC приводит к снижению уровня TNF в моделях на культуре *in vitro*. При развитии цисплатин-

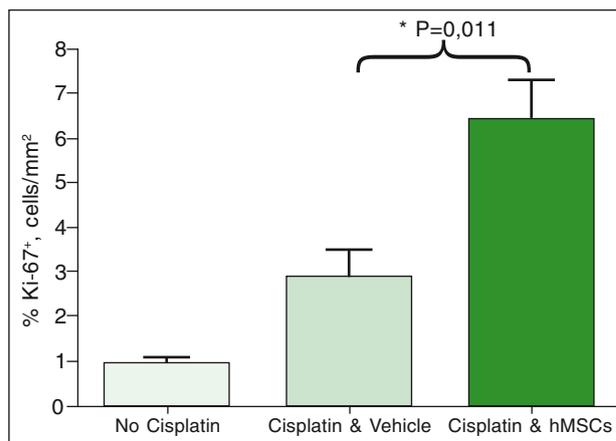
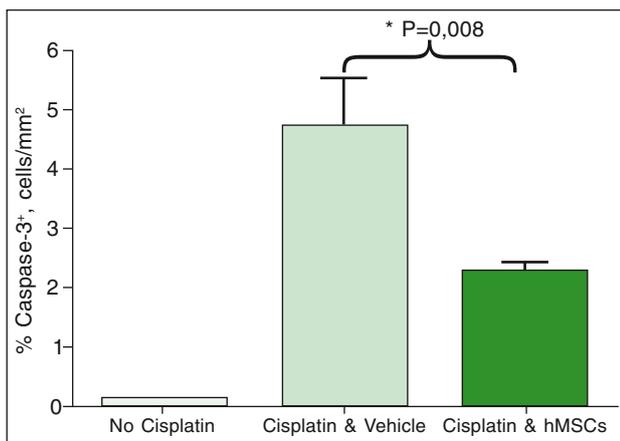


Рис. 3. Определение уровня экспрессии каспазы-3 и Ki-67 с помощью иммуногистохимического анализа (по Eliopoulos и др. [9])

индуцированной почечной недостаточности концентрация таких провоспалительных медиаторов, как TNF-альфа и IL-1бета, IL-6, 8, резко повышается [25, 26]. При добавлении MSC в культуру клеток канальцевого эпителия почек, обработанных цисплатином, некоторыми учеными было зафиксировано значительное снижение как уровня TNF-альфа, так и уровня IL-1-бета [5] (рис. 4). *In vivo* на модели ЛПС-индуцированной легочной недостаточности также отмечали снижение уровня TNF, IL-6, IFN-гамма в сыворотке животных, которым были внутримышечно введены MSC, по сравнению с контрольной группой [11].

Ряд же авторов, исследовавших развитие острой легочной недостаточности, индуцированной ЛПС, не обнаружили четкого действия MSC или MSC-СМ на уровень TNF-альфа [4, 8].

Кроме того, в последнее время появляются достаточно интересные данные о возможных специфических способах «нейтрализации» TNF мезенхимальными стволовыми клетками.

Так, Yagi и др. пишут о важной роле рецептора sTNFR1 (растворимый рецептор фактора некроза опухолей-1) в развитии противовоспалительного эффекта [11]. Синтез данного рецептора напрямую связан с активацией NFκB, при блокаде которого снижается продукция как sTNFR1, так и самого TNF-альфа. При воспалительной реакции ЛПС, а также и сам TNF, связываясь с рецепторами на поверхности клетки (например, TLR), могут активировать NFκB, что приводит к усилению синтеза sTNFR1, в том числе и сами-

ми MSC. В то же время было совершенно четко показано, что внесение MSC приводит к снижению интенсивности воспалительной реакции как в культуре *in vitro*, так и *in vivo* на модели острой легочной недостаточности. Авторы предполагают, что в данном случае срабатывает механизм обратной отрицательной связи и повышенная секреция sTNFR1 приводит к снижению продукции TNF-альфа. Это подтверждается тем, что при введении моноклональных антител, блокирующих sTNFR1, одновременно с MSC *in vivo* снижается положительный эффект, а уровень провоспалительных цитокинов (TNF-альфа, IL-6, IFN-гамма) в сыворотке животных возрастает [11].

Существует и ряд других агентов, вырабатываемых MSC и модулирующих воспалительную реакцию.

Danchuk и соавт. акцентируют свое внимание на повышенной экспрессии (более чем в 900 раз) гена TGF-6 в ответ на воспалительную реакцию, вызванную ЛПС на модели отека легких и острой легочной недостаточности. Повышение экспрессии этого гена приводит к повышенной продукции TNF-альфа-индуцированного протеина 6, обладающего противовоспалительными свойствами. Этот белок активирует интер-альфа-ингибитор (I-alfa-I), который, в свою очередь, ингибирует сериновые протеазы – важнейшее звено развития воспалительной реакции [27]. Кроме того, было показано, что блокирование гена TGF-6 с помощью метода интерференции РНК приводит к значительному (хотя и не полному) снижению эффекта, что в данной работе

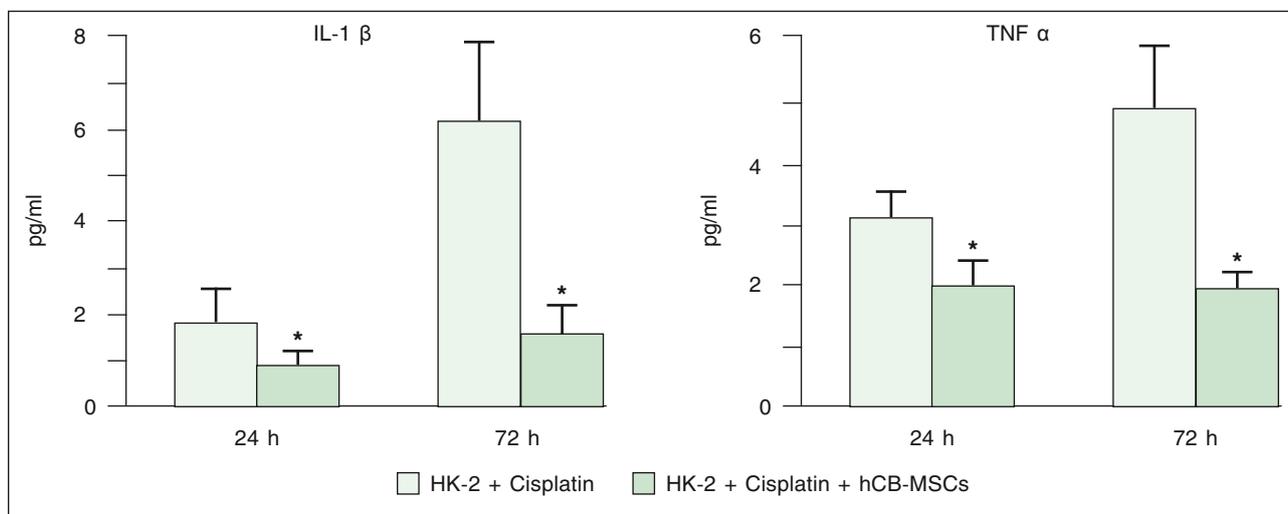


Рис. 4. Уровни ИЛ-1-бета и ФНО-альфа на модели цисплатин-индуцированной почечной недостаточности в культуре *in vitro* при внесении MSC и в контроле (по Morigib и др.)

проявлялось в прогрессировании легочной недостаточности и отека легких [10]. В других работах было показано, что TGF-6 играет значительную роль в развитии положительного эффекта, полученного при внесении hMSC в модель инфаркта миокарда [28, 29].

Продукция другого мощного противовоспалительного цитокина, IL-10, мезенхимальными стволовыми клетками также исследовалась в ряде работ. Однако данные по этому вопросу разнятся. Часть авторов сообщают, что не выявили значимых изменений уровня IL-10 при использовании MSC и MSC-СМ в различных моделях *ex vivo* и *in vitro* [8, 30, 31].

В то же время Yagi и соавт., используя метод РТ-ПЦР, выявили 3-кратное увеличение уровня экспрессии гена IL-10 стволовыми клетками, которые культивировались с внесением «воспалительной» сыворотки (полученной от животных с ЛПС-индуцированным воспалительным синдромом либо термическим ожогом) по сравнению с контролем [4]. Danchuk и соавт. в своей работе на модели ЛПС-индуцированной легочной недостаточности выявили небольшое увеличение концентрации IL-10 [10]. Некоторые другие работы четко демонстрируют, что MSC могут влиять на продукцию IL-10 макрофагами и дендритными клетками [32, 33].

Тем не менее, практически все работы отмечают снижение уровня провоспалительных цитокинов: IL-1-альфа и бета, IL-6, IL-17, IFN-гамма, G-CSF, GM-CSF, MIP-2, MCP-1 при использовании MSC либо MSC-СМ как на моделях *in vitro*, так и *in vivo* и *ex vivo* [4, 5, 9, 11] (рис. 5).

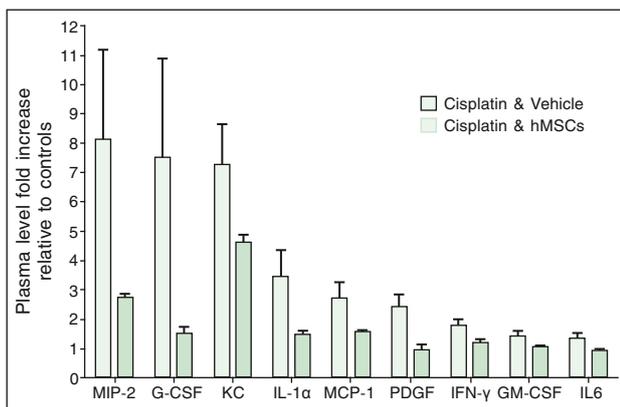


Рис. 5. Анализ цитокинов в крови мышей. Кровь была взята на 4-е сутки после интраперитонеального введения MSC (модель цисплатин-индуцированной почечной недостаточности) (по Nicoletta Eliopoulos, Jing Zhao, Manaf Bouchentouf, Kathy Forner и др.)

Четкие механизмы, приводящие к данному эффекту, остаются до сих пор неизвестными, однако постепенно появляются данные, способные отчасти пояснить такое воздействие MSC. Так, при исследовании экспрессии рецептора-антагониста IL-1(IL-1RN) с помощью РТ-ПЦР было выявлено, что уровень экспрессии гена IL-1RN мезенхимальными стволовыми клетками возрастает более чем в 5 раз при внесении ЛПС, хотя базальный уровень экспрессии этого цитокина весьма низок [10].

MIP-2 (макрофагальный воспалительный протеин), MCP-1 (белок-хемоаттрактант моноцитов), KC (фактор активации нейтрофилов-3) и другие являются мощными хемоаттрактантами гранулоцитарно-макрофагального звена и, как следствие, одними из ведущих факторов воспаления. При введении MSC особенно значительно падает секреция MIP-2 – мощного хемоаттрактанта нейтрофилов, что подтверждают американские ученые при помощи иммуноферментного анализа (ELISA) в работе на модели ЛПС-индуцированной легочной недостаточности с внесением MSC.

Также имеются данные, что MSC секретируют такие факторы, как TGF-бета и PGE2, которые могут ингибировать активацию лимфоцитов, что также способствует угнетению воспаления [34–36].

Сегодня появляется все больше работ, описывающих противовоспалительные эффект, приписываемый MSC и их паракринным факторам. Обобщает эти исследования общее признание способности MSC динамически реагировать на изменения своего микроокружения. Повышение в среде воспалительных факторов приводит к увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов и повышенной их секреции. Однако интересно то, что была зафиксирована способность MSC повышать экспрессию генов и провоспалительных цитокинов, таких как IL-1бета, IL-6 и IL-8 [7]. Это явление связывают с наличием на MSC Toll-like рецепторов (TLR, в особенности TLR4), которые активируются при связывании с фрагментами бактерий (ЛПС), вирусов и грибов, что ведет к синтезу провоспалительных цитокинов. Возможно, это один из механизмов обратной отрицательной связи в регуляции воспаления.

Наконец хотелось бы отметить интересную работу [14], в которой ученые исследовали секрецию мезенхимальными стволовыми клетками различных цитокинов (TNF, IL-6, VEGF) в зави-

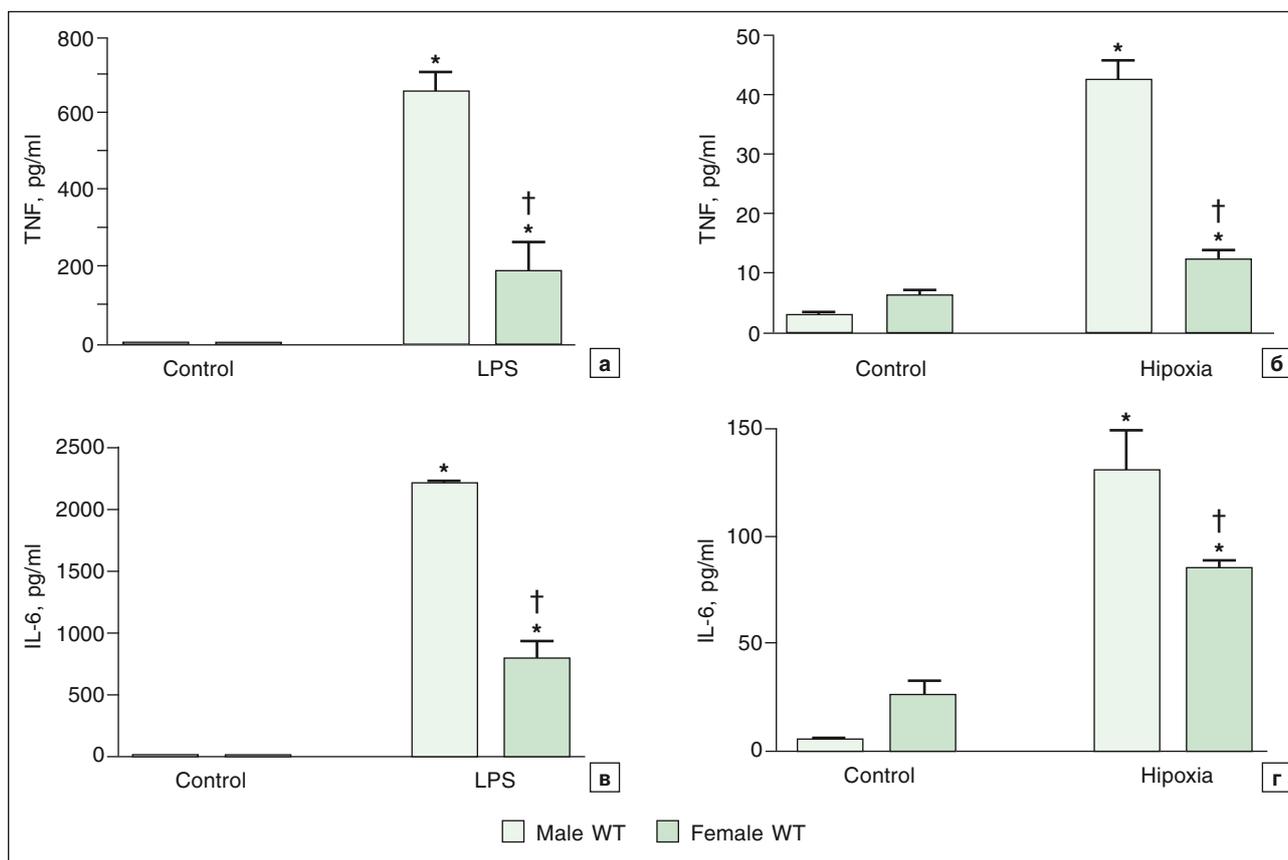


Рис. 6. Уровень TNF (по Crisostomo и Wang) (а, б) и IL-6 (по Crisostomo и Wang) (в, г), секретируемых MSC, у самцов и самок мыши при введении ЛПС и под воздействием гипоксии.

* – $p < 0,05$ vs control; † – M vs F.

симости от пола особей *in vivo*. И обнаружили, что у самок мыши при стимуляции MSC ЛПС или гипоксией уровень секреции VEGF несколько выше, а уровень секреции TNF и IL-6 значительно ниже, чем у самцов (рис. 6).

Таким образом, у женских особей меньше проявлялась провоспалительная активность и увеличивалась пролиферативная и регенераторная активность по сравнению с мужскими особями. Авторы предполагают возможную роль в этом эстрогенов. Имеются данные, что экзогенный эстроген может увеличивать активность MSC [37]; что на MSC содержится эстрогеновый рецептор-альфа, который, возможно, влияет на дифференцировку MSC [38], а также, что MAPK (Mitogen activated protein kinases) и циклинозависимые киназы могут быть посредниками пролиферативного эффекта эстрогенов на эмбриональные клетки мыши [39].

Выводы

Сегодня совершенно ясно, что протективное действие, оказываемое мезенхимальными стволовыми клетками, обусловлено, в том числе, их паракринными факторами. Перед медицинским и научным сообществом открывается огромное поле для исследований в этой области. Вполне вероятно, что использование стволовых клеток и их паракринных факторов станет одним из новых прогрессивных способов терапии самой различной патологии. Попытки понять и научиться контролировать продукцию и действие цитокинов несут в себе огромные перспективы лечения заболеваний, затрагивая самые тонкие механизмы их патогенеза. Появляется все больше работ по изучению каждого конкретного цитокина, выделяемого MSC, и выявляется, что блокирование хотя бы одного из них приводит к снижению «лечебного» эффекта.

Складывается ощущение, что выключение даже малейшего звена из сложнейшей сети цитокинов, приведет к снижению действия в целом. И вполне вероятно, что так оно и есть. Чем глубже будет изучаться проблема взаимодействия цитокинов между собой, чем четче мы сможем осознать, как конкретно изменяется баланс

цитокинов при той или иной патологии, тем, вероятно, быстрее мы сможем найти пути воздействия для коррекции цитокиновых нарушений, действуя точно на отклоненный фактор. Использование MSC и их кондиционированной среды, возможно, первый, но неотъемлемый шаг на этом пути.

Литература

1. Ярилин, А.А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.
2. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Брострофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
3. Heron, M. Deaths: leading causes for 2004 / M. Heron // *Natl. Vital Stat. Rep.* 2007. – Vol. 56 (5). – P. 1–95.
4. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Attenuate Organ Injury Induced by LPS and Burn / H. Yagi [et al.] // *Cell Transplant.* – 2010. – Vol. 19 (6). – P. 823–830.
5. Life-Sparing Effect of Human Cord Blood-Mesenchymal Stem Cells in Experimental Acute Kidney / M. Morigi [et al.] // *STEM CELLS.* – 2010. – Vol. 28 (3). – P. 513–522.
6. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Accelerate Recovery of Acute Renal Injury and Prolong Survival in Mice / M. Morigi [et al.] // *STEM CELLS.* – 2008. – 26 (8). – P. 2075–2082.
7. Growth factor and cytokine expression of human mesenchymal stromal cells is not altered in an in vitro model of tissue damage / K. Montzka // *Cytotherapy.* – 2010. – Vol. 12 (7). – P. 870–880.
8. Allogenic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung / W. Lee [et al.] // *PNAS.* – 2009. – Vol. 106(38). – P. 16357–16362.
9. Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection / N. Eliopoulos [et al.] // *AJP – Renal Physiol.* – 2010. – Vol. 299 (6). – P. 1288–1298.
10. Human multipotent stromal cells attenuate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via secretion of tumor necrosis factor- α -induced protein 6 / S. Danchuk [et al.] // *Stem Cell Research Therapy.* – 2011. – Vol. 2 (3). – P. 27.
11. Reactive Bone Marrow Stromal Cells Attenuate Systemic Inflammation via sTNFR1 / H. Yagi [et al.] // *Molecular Therapy.* – 2010. – Vol. 18 (10). – P. 1857–1864.
12. Stromal Cells Protect against Acute Tubular Injury via an Endocrine Effect / B. Bi [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – Vol. 18 (9). – P. 2486–2496.
13. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis / Y. Wu [et al.] // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25 (10). – P. 2648–2659.
14. Gender Differences In Injury Induced Mesenchymal Stem Cell Apoptosis and VEGF, TNF, IL-6 expression: Role of the 55 kDa TNF Receptor (TNFR1) / P.R. Crisostomo [et al.] // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2007. – Vol. 42 (1). – P. 142–149.
15. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer / T. Asahara [et al.] // *Circulation.* – 1996. – Vol. 94 (12). – P. 3291–3302.
16. Vascular endothelial growth factor induces branching morphogenesis tubulogenesis in renal epithelial cells in a neuropilin-dependent fashion / A. Karihaloo [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 25 (17). – P. 7441–7448.
17. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats / S.B. Miller [et al.] // *Am. J. Physiol.* 1994. – Vol. 266 (1Pt2). – P. 129–134.
18. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat / S.B. Miller [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89 (24). – P. 11876–11880.
19. The phosphoinositide-3 kinase gamma-Akt pathway mediates renal 2008, 73(4). tubular injury in cisplatin nephrotoxicity / H. Kuwana [et al.] // *Kidney Int.* – P. 430–445.
20. Lieberthal, W. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: Apoptosis vs necrosis / W. Lieberthal, V. Triaca, J. Levine // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 270 (4Pt2). – P. 700–708.
21. Low doses of insulinlike growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats / M. Garcia-Fernandez [et al.] // *Endocrinology.* – 2008. – Vol. 149 (5). – P. 2433–2442.
22. Hepatocyte growth factor protects small airway epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha or oxidative stress / M. Okada [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2004. – Vol. 56 (3). – P. 336–344.
23. Kumar, P. MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway / P. Kumar, A.L. Miller, P.J. Polverini // *Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279 (41). – P. 43352–43360.
24. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the P13K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis / S.C. Hung [et al.] // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25 (9). – P. 2363–2370.
25. Ramesh, G. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity / G. Ramesh, W.B. Reeves // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110. – P. 835–842.
26. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells / B. Zhang [et al.] // *Kidney Int.* – 2007. – Vol. 72 (1). – P. 37–44.
27. The link module from ovulation- and inflammation-associated protein TSG-6 changes conformation on hyaluronan binding / C.D. Blundell [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278 (49). – P. 49261–49270.
28. Milner, C.M. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? / C.M. Milner, V.A. Higman // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – Vol. 34 (Pt3). – P. 446–450.

29. Wisniewski, H.G. // Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14 / H.G. Wisniewski, J. Vilcek // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2004. – Vol. 15 (2-3). – P. 129-146.
30. Cytokine secretion by human mesenchymal stem cells cocultured with damaged corneal epithelial cells / J.Y. Oh [et al.] // *Cytokine.* – 2009. – Vol. 46 (1). – P. 100-103.
31. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells / B. Parekkadan [et al.] // *Biochem Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 363 (2). – P. 247-252.
32. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F. Pittenger // *Blood.* – 2005. – Vol. 105 (4). – P. 1815-1822.
33. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production / K. Nemeth [et al.] // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15 (1). – P. 42-49.
34. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells / M.E. Groh [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2005. – Vol. 33 (8). – P. 928-934.
35. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F. Pittenger // *Blood.* – 2005. – Vol. 105 (4). – P. 1815-1822.
36. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells / P.A. Sotiropoulou [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24 (1). – P. 74-85.
37. Estrogen receptor alpha genotype confers interindividual variability of response to estrogen and testosterone in mesenchymal-stem-cell-derived osteoblasts / H.V. Leskela [et al.] // *Bone.* – 2006. – Vol. 39 (5). – P. 1026-1034.
38. Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells / Q. Wang [et al.] // *Biochem Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 347 (1). – P. 117-23.
39. Han, H.J. Estradiol-17beta stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes / H.J. Han, J.S. Heo, Y.J. Lee // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 290 (4). – P. 1067-1075.
40. Симбирцев, А.С. Перспективы применения препаратов цитокинов в дерматовенерологии / А.С. Симбирцев // *Практическая медицина.* – 2011. – № 49. – С. 15-22.
41. Хаитов, Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович. – М. : Медицина, 2000. – 432 с.
42. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury / E. Sykova [et al.] // *Cell. Transplant.* – 2006. – Vol. 15 (8-9). – P. 675-687.
43. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte – macrophage colony stimulating factor / H.C. Park [et al.] // *Tissue Eng.* – 2005. – Vol. 11 (5-6). – P. 913-922.
44. Figure 15-60: BAD phosphorylation by Akt. *Molecular biology of the cell* / B. Alberts. – New York : Garland Science, 2002.
45. Низкомолекулярные пептидные препараты, полученные из культивированных стволовых клеток, при лечении острой почечной недостаточности / М.Ш. Хубутия [и др.] // *Трансплантология.* – 2011. – № 4. – С. 20-25.