



Влияние пулирования мезенхимальных стволовых клеток на подавление пролиферативной активности Т-лимфоцитов

Е. Г. Рында, А. Е. Гончаров, Н. Г. Антоневиц

Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Беларусь

Резюме

Цель исследования. Определить влияние пулирования (объединения) одиночных культур мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки (МСК ОВ) носовой полости на подавление пролиферативной активности Т-лимфоцитов.

Материалы и методы. Методом проточной цитометрии была проведена оценка влияния пулирования одиночных культур МСК ОВ, полученных от здоровых доноров ($n = 7$), на митоген-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов периферической крови добровольцев ($n = 5$). Оценка индекса пролиферации и числа поделившихся $CD3^+$ клеток проводили по изменению интенсивности флуоресценции красителя Tag-it Vio. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрических методов.

Результаты. С учетом использования пяти образцов периферической крови добровольцев выполнена оценка 35 вариантов сокультивирования одиночных МСК с Т-клетками и 33 вариантов сокультивирования пулМСК с Т-клетками. Был установлен ингибирующий эффект как одиночных ($p = 0,0001$), так и пулМСК ОВ ($p = 0,0001$) на ФГА-индуцированную пролиферацию $CD3^+$ Т-клеток суммарной фракции лимфоцитов периферической крови. Показано, что пулМСК ОВ оказывают достоверно более выраженный супрессивный эффект на пролиферацию Т-клеток в сравнении с одиночными МСК ($p = 0,000004$).

Заключение. ПулМСК оказывают достоверно более выраженный эффект в отношении подавления ФГА-индуцированной пролиферации Т-клеток периферической крови в сравнении с монокультурами МСК, что обосновывает применение пулМСК в медицине с целью достижения лучших результатов в лечении иммуноопосредованных заболеваний.

Ключевые слова: пулированные мезенхимальные стволовые клетки, проточная цитометрия, иммунофенотипирование, стволовые клетки

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочитали и одобрили финальную версию для публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование проведено без финансовой поддержки.

Для цитирования: Рында ЕГ, Гончаров АЕ, Антоневиц НГ. Влияние пулирования мезенхимальных стволовых клеток на подавление пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Проблемы здоровья и экологии. 2024;21(2):97–102. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2024-21-2-12>

Influence of pooling mesenchymal stem cells on the suppression of proliferative activity of T-lymphocytes

Alena H. Rynda, Andrei Y. Hancharou, Natalia G. Antonevich

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Abstract

Objective. To determine the effect of pooling (merging) of single cultures of olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells (MSCs) of the nasal cavity on the suppression of the proliferative activity of T-lymphocytes.

Materials and methods. Using flow cytometry, the effect of pooling single cultures of MSCs obtained from healthy donors ($n=7$) on the mitogen-induced proliferation of T-lymphocytes in the peripheral blood of volunteers ($n=5$) was studied. The proliferation index and the number of dividing $CD3^+$ T-cells were assessed by changes in the fluorescence intensity of Tag-it Vio. Statistical processing of the obtained data was carried out using non-parametric statistics.

Results. An evaluation of 35 variants of co-culture of single MSCs with T-cells and 33 variants of co-culture of pooled MSCs with T-cells was performed. The inhibitory effect of both single ($p = 0.0001$) and pooled MSCs ($p = 0.0001$) on

PHA-induced proliferation of CD3⁺ T-cells in the total fraction of peripheral blood lymphocytes was identified. It was shown that pooled MSCs have a significantly more pronounced suppressive effect on T-cell proliferation compared to single MSCs ($p=0.000004$).

Conclusion. PoolMSCs have a significantly more pronounced effect in suppressing PHA-induced proliferation of peripheral blood T-cells compared to MSC monocultures, which justifies the use of poolMSCs in medicine to achieve better results in the treatment of immune-mediated diseases.

Keywords: *pooled mesenchymal stem cells, flow cytometry, immunophenotyping, stem cells*

Author contributions. All authors made significant contributions to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was conducted without financial support.

For citation: Rynda AH, Hancharou AY, Antonevich NG. Influence of pooling mesenchymal stem cells on the suppression of proliferative activity of T-lymphocytes. *Health and Ecology Issues*. 2024;21(2):97–102. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2024-21-2-12>

Введение

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой мультипотентные клетки, которые являются идеальной основой для клеточной терапии различных заболеваний благодаря их иммуносупрессивным и регенерирующим свойствам, а также низкой иммуногенности и относительно простому и безопасному способу получения [1–3]. Источниками получения МСК могут служить различные органы и ткани человека, такие как костный мозг (КМ), жировая ткань, пуповинная кровь, пульпа зуба, обонятельная выстилка (ОВ).

Благодаря низкой иммуногенности и отсутствию на клеточной поверхности молекул HLA-DR возможно применение как аутологичных ауто-МСК, (ауто-МСК, когда донор и реципиент — один и тот же человек), так и аллогенных (алло-МСК, донор биоптата и конечный реципиент отличаются) МСК [4, 5]. Ауто-МСК, однако, имеют ряд потенциальных ограничений, что затрудняет их широкое применение. Это особенности физического состояния организма, например недостаточная масса тела при получении МСК жировой ткани, возраст или невозможность забора КМ у пациентов с миелофиброзом [6, 7]. Также некоторые системные заболевания, такие как диабет [8], ревматоидный артрит [9] и системная красная волчанка [10], изменяют свойства МСК, тем самым нарушая их функциональные характеристики. Таким образом, применение ауто-МСК в некоторых случаях является сложной задачей. Решением этой проблемы может выступать использование алло-МСК от молодых здоровых доноров.

Способность МСК влиять на иммунную систему представляет большой интерес для практического применения в медицине, но является не до конца изученной. Благодаря широкому спектру синтезируемых растворимых факторов

МСК могут участвовать в регуляции активации и пролиферации Т-лимфоцитов и в целом оказывать влияние на созревание и функции других иммунных клеток [11–14].

В последние годы появляется все больше данных о том, что пулированные (объединенные) культуры аллогенных МСК (пулМСК) обладают более выраженными и стабильными иммуномодулирующими свойствами в отношении иммунокомпетентных клеток, а также проявляют меньшую донор-зависимую вариабельность в сравнении с МСК, полученными от одного донора [15, 16]. Так, при пулировании культур МСК КМ было показано улучшение иммуносупрессивных свойств полученных объединенных культур в сравнении с одиночными культурами [17]. В другом исследовании, проводимом также на МСК КМ, не удалось выявить значительную разницу во влиянии на активацию Т-лимфоцитов между одиночными клетками и пулМСК [18].

Цель исследования

Определить влияние пулирования (объединения) одиночных культур мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки (МСК ОВ) носовой полости на подавление пролиферативной активности Т-лимфоцитов.

Материалы и методы

Получение культур пулМСК. Первичные культуры МСК ОВ получали методом эксплантов. Донорами биоптата ОВ являлись здоровые добровольцы ($n = 7$). Биоптат (фрагмент ОВ размером 2–5 мм) три раза отмывали в буфере DPBS с антибиотиками (гентамицина сульфат в концентрации 50 мкг/мл) в течение 8–10 минут, затем переносили в 6-луночный культуральный планшет для измельчения до размера 0,5–1,5 мм и прикрепления фрагментов к культуральной поверхности. Накапливали биомассу клеток

на протяжении 1–2 пассажей с использованием бессывороточной среды STEMPRO® MSC SFM (Thermo Fisher Scientific, США). При достижении конfluence монослоя клетки отделяли стандартным методом с использованием раствора 0,1 % трипсина / 0,02 % ЭДТА. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе (5 % CO₂, +37 °C, влажность — 95 %). На третьем пассаже производили пулирование трех одиночных культур, полученных от разных доноров в равном соотношении (1:1:1).

Выделение мононуклеаров периферической крови. Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли из 15–20 мл венозной крови здоровых добровольцев (n = 5). В пробирки для градиентного центрифугирования объемом 12 мл вносили стерильный градиент плотности Histopaque-1077 ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$), на который наслаивали разведенную кровь. Центрифугировали пробирки 15 минут при 3000 об/мин. Собирали кольцо мононуклеаров, промывали клетки два раза в DPBS, ресуспендировали в 1 мл среды AIM-V.

Сокультивирование МСК с МПК. Для получения монослойной культуры за сутки до начала совместного культивирования с МПК одиночные и пулированные МСК ОБ четвертого пассажа высеивали на 12-луночные планшеты (100 тыс. клеток/лунка). Свежевыделенные МПК окрашивали витальным красителем Tag-it Violet (Biolegend, США) для определения пролиферации. Проводили следующие варианты сокультивирования: вариант 1 — отрицательный контроль (МПК в 1 мл AIM-V); вариант 2 — положительный контроль (МПК в 1 мл AIM-V с фитогемагглютинином (ФГА)); вариант 3 — контактное сокультивирование (из лунки с монослоем МСК ОБ удаляли ростовую среду и вносили 1 мл суспензии МПК, ФГА). Соотношение МПК к МСК составляло 1:10–1:15 (1,0–1,5 млн МПК/лунка). Неспецифический поликлональный митоген ФГА для индукции пролиферации вносили в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Учет пролиферативной активности Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии. После инкубации в течение 4–5 суток оценивали пролиферативную активность Т-лимфоцитов и фенотип клеток методом проточной цитометрии с использованием следующих моноклональных антител и зондов: CD3 (APC-Cy7, клон UCNT1) (Exbio, Чехия), 7-AAD (Life Technologies, США), Tag-it Vio (BioLegend, США).

Суспензию клеток тщательно отбирали из каждой лунки, осаждали центрифугированием (5 минут, 200–300×g). К осадку, ресуспендированному в DPBS, добавляли указанные выше моноклональные антитела и зонды и инкубировали

в темноте в течение 15 минут при температуре от +2 до +8 °C. После завершения инкубации проводили отмывку проб путем центрифугирования (5 минут, 200–300×g) в DPBS, образовавшуюся взвесь клеток разбавляли в 200 мкл DPBS, перемешивали содержимое пробирок на шейкере и учитывали с помощью проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Statistica», 12 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение

Оценка супрессивной активности МСК в отношении митоген-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов является одним из наиболее информативных методов исследования, позволяющих провести сравнение иммуномодулирующей активности и спрогнозировать терапевтическую эффективность культур МСК.

В ходе исследования была проведена оценка и сравнение иммуномодулирующих свойств одиночных (n = 7) и пулМСК ОБ (n = 7), полученных от здоровых добровольцев и засеянных на культуральные планшеты на четвертом пассаже накануне постановки сокультивирования с МПК. С учетом использования пяти образцов периферической крови добровольцев выполнена оценка 35 вариантов сокультивирования моноМСК с Т-клетками и 33 вариантов сокультивирования пулМСК с Т-клетками.

На четвертые сутки сокультивирования перед учетом на проточном цитометре проводили визуальный контроль всех образцов под микроскопом (рисунок 1).

Отмечали наличие характерных клеточных агрегатов в пробах положительного контроля (МПК в питательной среде с добавлением ФГА), которые образуют пролиферирующие Т-лимфоциты, в то же время в лунках с отрицательным контролем и лунках сокультивирования МСК с МПК фиксировали отсутствие визуальных признаков пролиферативной активности.

После визуального контроля проводили оценку индекса пролиферации (ИП) и числа поделившихся CD3⁺ клеток по изменению интенсивности флуоресценции красителя Tag-it Vio в программе FCS Express 7 (De Novo Software, США) используя встроенные алгоритмы. В процессе учета событий последовательно выполнялись следующие шаги:

1) последовательное гейтирование одиночных клеток на цитограмме в координатах SSC-H/SSC-A;

2) выделение целевой популяции МПК путем построения цитограммы в координатах прямого и бокового светорассеивания;

3) выделение региона жизнеспособных Т-клеток путем построения цитограммы в координатах CD3/7-AAD;

4) полученный регион проецировали на гистограмму интенсивности флуоресценции Tag-it

Vio. Определяли количество пролиферирующих Т-клеток относительно принятого порогового значения, выставленного по образцу окрашенного отрицательно контроля (рисунок 2).

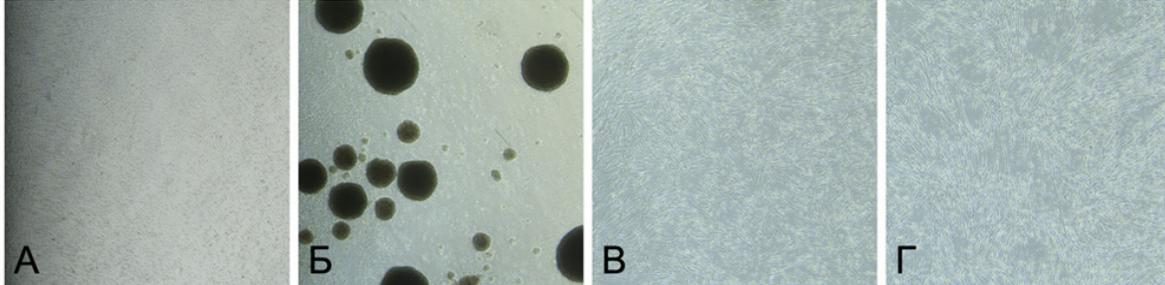


Рисунок 1. Типичное изображение пролиферации МПК: А — отрицательный контроль (МПК в питательной среде без добавления ФГА); Б — положительный контроль (МПК в питательной среде с добавлением ФГА); В — сокультивирование одиночных клеток МСК с МПК; Г — сокультивирование пулМСК с МПК. Увеличение $\times 4$

Figure 1. Typical image of PBMC proliferation: A — negative control (PBMCs in a nutrient medium without the addition of PHA); B — positive control (PBMCs in a nutrient medium with the addition of PHA); C — co-cultivation of single MSC cells with PBMCs; D — co-cultivation of pooled MSCs with PBMC, magnification $\times 4$

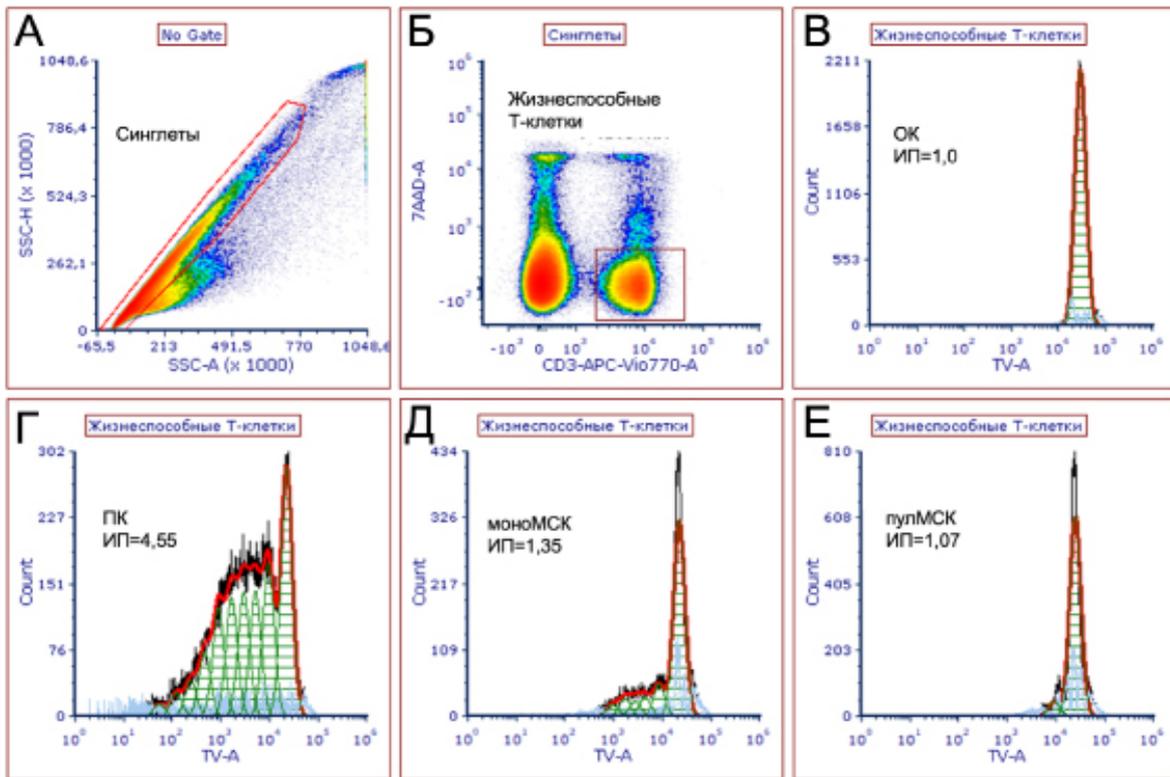


Рисунок 2. Учет методом проточной цитометрии пролиферативной активности Т-лимфоцитов: А — гейтирование одиночных клеток (синглетов); Б — построение цитограммы для выделения региона жизнеспособных CD3+ Т-клеток; пролиферативная активность Т-клеток: В — отрицательный контроль (DPBS), Г — положительный контроль (ФГА), Д — монокультуры МСК, Е — пулМСК (рисунок разработан авторам)

Figure 2. Accounting using flow cytometry of the proliferative activity of T-lymphocytes: A — gating of single cells (singlets); B — construction of a cytogram to isolate the region of viable CD3+ T-cells; proliferative activity of T-cells in: B — control negative (DPBS), D — control positive (PHA), E — monocultures of MSCs, E — pool MSCs (Figure was developed by the authors)

Индекс пролиферации в отрицательном контроле составил 1,01 (1,0–1,03) усл. ед. Стимуляция МПК с использованием ФГА значительно

увеличила пролиферативную активность Т-клеток (ИП — 3,86 (3,21–4,47) усл. ед.) (рисунок 3).

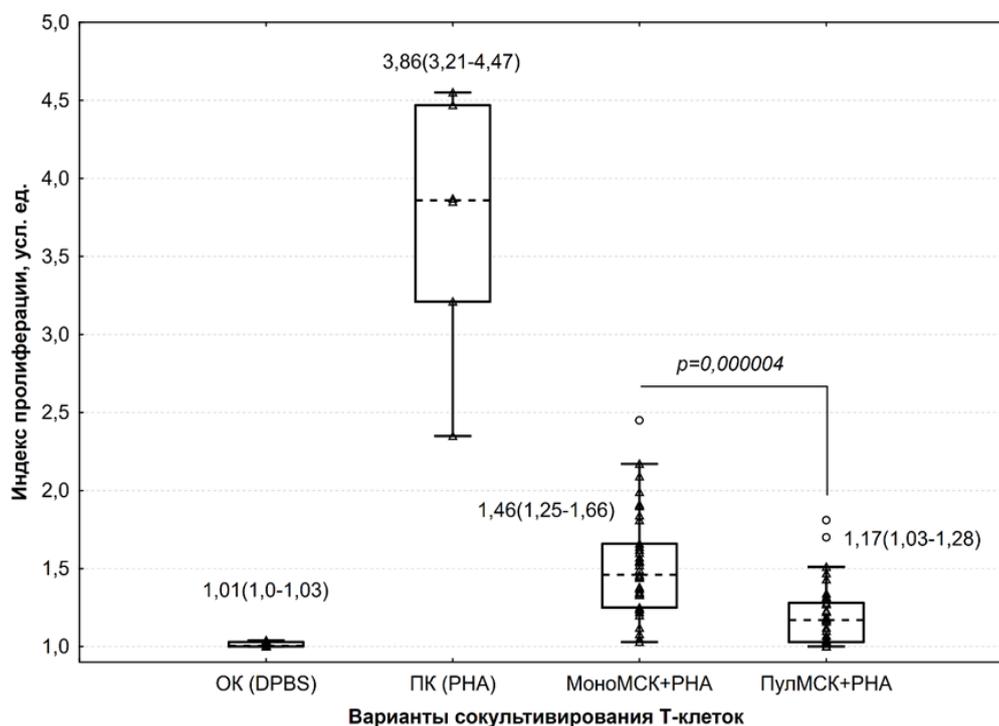


Рисунок 3. Влияние одиночных и пулированных культур МСК на пролиферативную активность Т-клеток.
(рисунок разработан авторами)

Figure 3. Effect of single and pooled MSC cultures on the proliferative activity of T-cells.
(Figure was developed by the authors)

Индекс пролиферации Т-клеток при сокультивировании как с одиночными (ИП — 1,46 (1,25–1,66)), так и с пулМСК (ИП — 1,17 (1,03–1,28)) был близок к показателю отрицательного контроля, что свидетельствует о наличии ингибирующего эффекта МСК ОБ на ФГА-индуцированную пролиферацию CD3⁺ Т-клеток суммарной фракции лимфоцитов периферической крови ($p = 0,0001$).

При сравнении ингибирующего потенциала одиночных и пулМСК ОБ было установлено, что пулМСК ОБ оказывают достоверно более выраженный супрессивный эффект

на пролиферацию Т-клеток в сравнении с одиночными культурами МСК ($p = 0,000004$).

Заключение

В серии экспериментов показано, что пулМСК оказывают достоверно более выраженный эффект в отношении подавления ФГА-индуцированной пролиферации Т-клеток периферической крови в сравнении с монокультурами МСК. Таким образом, результаты исследования обосновывают применение пулМСК в медицине с целью достижения лучших результатов в лечении иммуноопосредованных заболеваний.

Список литературы / References

- Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal stem cells current clinical applications: a systematic review. *Archives of Medical Research*. 2021;52(1):93-101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>
- Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative Medicine*. 2019;4(1):22. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>
- Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. 2020;53(1): e12712. DOI: <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>
- Huang Y, Yin Y, Gu Y, Gu Q, Yang H, Zhou Z, et al. Characterization and immunogenicity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under osteoporotic conditions. *Science China Life Sciences*. 2020;63:429-442. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1555-9>
- Wang Y, Tian M, Wang F, Heng BC, Zhou J, Cai Z, et al. Understanding the immunological mechanisms of mesenchymal stem cells in allogeneic transplantation: from the aspect of major histocompatibility complex class I. *Stem Cells and Development*. 2019;28(17):1141-1150. DOI: <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0256>
- Ganguly, P., El-Jawhari, J. J., Giannoudis, P. V., Burska, A. N., Ponchel, F., Jones, E. A. (2017). Age-related changes in bone marrow mesenchymal stromal cells: a potential impact on osteoporosis and osteoarthritis development. *Cell transplantation*. 2017; 26(9): 1520-1529.
- Wang, Q., Xu, N., Wang, Y., Zhang, X., Liu, L., Zhou, H. et al. Allogeneic stem cell transplantation combined with transfusion

of mesenchymal stem cells in primary myelofibrosis: a multicenter retrospective study. *Frontiers in Oncology*. 2022; 11: 792142.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.792142>

8. Fijany A, Sayadi LR, Khoshab N, Banyard DA, Shaterian A., Alexander M, et al. Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes. *Molecular Biology Reports*. 2019;46:1459-1475.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4516-x>

9. Pedrosa M, Gomes J, Laranjeira P, Duarte C, Pedreiro S, Antunes B, et al. Immunomodulatory effect of human bone marrow-derived mesenchymal stromal/stem cells on peripheral blood T cells from rheumatoid arthritis patients. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2020;14(1):16-28.

10. Cheng RJ, Xiong AJ, Li YH, Pan SY, Zhang QP, Zhao Y, et al. Mesenchymal stem cells: allogeneic MSC may be immunosuppressive but autologous MSC are dysfunctional in lupus patients. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019;7:285.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00285>

11. Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. 2020;53(1):e12712.

DOI: <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>

12. El-Sayed M, El-Feky MA, El-Amir MI, Hasan AS, Tag-Adeen M, Urata Y, et al. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells: Cell origin and cell quality variations. *Molecular Biology Reports*. 2019;46:1157-1165.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683003>

13. Castro LL, Lopes-Pacheco M, Weiss DJ, Cruz FF, Rocco PRM. Current understanding of the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells. *Journal of Molecular Medicine*. 2019;97:605-618.

14. Negi N, Griffin MD. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: Current understanding and clinical relevance. *Stem Cells*. 2020;38(5):596-605.

DOI: <https://doi.org/10.1002/stem.3151>

15. Kannan S, Viswanathan P, Gupta PK, Kolkundkar UK. Characteristics of pooled wharton's jelly mesenchymal stromal cells (WJ-MSCs) and their potential role in rheumatoid arthritis treatment. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2022;18(5):1851-1864.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10344-w>

16. Widholz B, Tsitlakidis S, Reible B, Moghaddam A, Westhauser F. Pooling of patient-derived mesenchymal stromal cells reduces inter-individual confounder-associated variation without negative impact on cell viability, proliferation and osteogenic differentiation. *Cells*. 2019;8(6):633.

DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8060633>

17. Kuçi Z, Böning H, Kreyenberg H, Bunos M, Jauch A, Janssen JW, et al. Mesenchymal stromal cells from pooled mononuclear cells of multiple bone marrow donors as rescue therapy in pediatric severe steroid-refractory graft-versus-host disease: a multicenter survey. *Haematologica*. 2016;101(8):985.

DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.140368>

18. Hejretová, L., Čedíková, M., Dolejšová, M., Vlas, T., Jindra, P., Lysák, D. et al. Comparison of the immunomodulatory effect of single MSC batches versus pooled MSC products. *Cell and Tissue Banking*. 2020; 21:119-129.

Информация об авторах / Information about the authors

Рында Елена Геннадьевна, аспирант лаборатории иммунологии и вирусологии, ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2218-2349>

e-mail: alenarynda@gmail.com

Гончаров Андрей Евгеньевич, к.м.н., доцент, директор ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4869-9864>

e-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Антоневиц Наталья Георгиевна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии, ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9535-7157>

e-mail: antonevich.n@gmail.com

Alena H. Rynda, Postgraduate Student at the Laboratory of Immunology and Virology, Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2218-2349>

e-mail: alenarynda@gmail.com

Andrei Y. Hancharou, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Director of the Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4869-9864>

e-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Natalia G. Antonevich, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9535-7157>

e-mail: antonevich.n@gmail.com

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Антоневиц Наталья Георгиевна

e-mail: antonevich.n@gmail.com

Natalia G. Antonevich

e-mail: antonevich.n@gmail.com

Поступила в редакцию / Received 25.03.2024

Поступила после рецензирования / Accepted 16.05.2024

Принята к публикации / Revised 31.05.2024