

## БЦЖ-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИП МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК: ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ

Я. Ш. ШВАРЦ<sup>1,2</sup>, С. Н. БЕЛОГОРОДЦЕВ<sup>1,3</sup>, А. Е. ПЕТРЕНКО<sup>1</sup>, Л. О. ДЕГТЯРЕВА<sup>2</sup>, А. И. ШАХМУРАДОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» Минздрава России, г. Новосибирск

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», г. Новосибирск

<sup>3</sup>ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск

При микобактериальной инфекции в очагах гранулематозной инфильтрации содержится большое количество мезенхимальных стволовых клеток (МСК), функциональный фенотип которых и, соответственно, функция в противотуберкулезном иммунитете неизвестны.

**Цель исследования:** охарактеризовать фенотип МСК, формирующийся при их взаимодействии с *M. bovis* БЦЖ, и оценить изменения этого фенотипа под действием ингибиторов и стимуляторов иммунорегуляторной активности.

**Материалы и методы:** МСК, полученные из костного мозга мышей, культивировали в присутствии или отсутствии *M. bovis* БЦЖ и/или агониста TLR3 полудана и методами иммуноферментного анализа оценивали влияние последних на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов. Методами проточной цитометрии и радиоактивного анализа оценивали влияние культуральной жидкости БЦЖ- и полудан-кондиционированных МСК на пролиферативную и апоптотическую активность спленоцитов. В часть культур вместе с БЦЖ или полуданом добавляли ингибиторы индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) или NO синтазы и оценивали вклад ИДО, ЦОГ-2 и NO в БЦЖ- и полудан-индуцированный ответ.

**Результаты.** Показана провоспалительная поляризация МСК под действием БЦЖ и полудана. Провоспалительный фенотип МСК коррелировал с их антиапоптотической и ростостимулирующей активностью по отношению к спленоцитам. Продемонстрировано, что ИДО и NO сдерживают БЦЖ-индуцированную поляризацию, а активность ЦОГ-2, наоборот, способствует БЦЖ-индуцированной провоспалительной поляризации МСК.

**Выводы.** 1. МСК являются активными участниками формирования иммунологической антимикобактериальной резистентности. 2. Таргетное регулирование продукции ИДО и оксида азота может быть целесообразно для формирования противотуберкулезного вакцинального иммунитета и для борьбы с микобактериальной инфекцией.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, БЦЖ, полудан, цитокины, оксид азота, циклооксигеназа-2, индоламин-2,3-диоксигеназа.

## BCG-INDUCED PRO-INFLAMMATORY PHENOTYPE OF MESENCHYMAL STEM CELLS: EFFECT OF IMMUNE MODULATORS

YA. SH. SHVARTS<sup>1,2</sup>, S. N. BELOGORODTSEV<sup>1,3</sup>, A. E. PETRENKO<sup>1</sup>, L. O. DEGTYAREVA<sup>2</sup>, A. I. SHAKHMURADOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>Research Institute of Therapy and Preventive Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

In case of mycobacterial infection the granulomatous infiltration foci contain the significant amount of mesenchymal stem cells (MSC), which functional phenotype and respective function in anti-tuberculosis immune defense remain unknown.

**Goal of the study:** to characterize the MSC phenotype, formed by their interaction with BCG of *M. bovis* and to evaluate the changes in this phenotype caused by the action of inhibitors and stimulants of immune regulatory action.

**Materials and methods:** MSC retrieved from bone marrow of mice were cultured with the presence and absence of BCG of *M. bovis* and/or poludanum TLR3 agonist; and the effect of two latter on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines was evaluated by enzyme multiplied immunoassay. Flow cytometry and radioactive testing were used to evaluate the impact of cultured BCG fluid and poludanum-conditioned MSC on the proliferative and apoptotic activity of splenocytes. The inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), cyclooxygenase-2 (COG-2) or NO synthase were added to certain cultures alone with BCG and poludanum, and the contributions of IDO, COG-2 and NO to BCG and poludanum-induced response were assessed. **Results.** Pro-inflammatory polarization of MSC under the action of BCG and poludanum was demonstrated. Pro-inflammatory MSC phenotype correlated to their anti-apoptogenic and growth-stimulating actions on the splenocytes. It was demonstrated that IDO and NO restrained BCG-induced polarization and conversely COG-2 promoted BCG-induced pro-inflammatory polarization of MSC.

**Conclusions.** 1. MSC actively participate in the formation of immunologic anti-mycobacterial resistance. 2. Targeted regulation of IDO and NO production can be feasibly applied for formation of anti-tuberculous vaccinal immunity and control mycobacterial infection.

**Key words:** mesenchymal stem cells, BCG, poludanum, cytokines, nitrogen oxide, cyclooxygenase-2, indoleamine 2,3-dioxygenase.

При микобактериальной инфекции иммуновоспалительный ответ в органе поражения формируется главным образом в виде фокусов гранулематозной мононуклеарной инфильтрации, в центре которых находятся внутриклеточно расположенные и/или свободно лежащие микобактерии, окружен-

ные преимущественно макрофагами, лимфоцитами и другими иммунокомпетентными клетками. Недавно показано, что в гранулематозных инфильтратах, вызванных микобактериями, находится большое количество мезенхимальных стволовых клеток (МСК), функция которых в противотуберкулезном

иммунитете неясна [10]. С одной стороны, эти клетки способны синтезировать NO, который подавляет рост и распространение микобактерий, а с другой – супрессировать Т-клеточный иммунный ответ [7]. В последние годы обнаружена способность МСК к функциональной поляризации, то есть к генерации не только анти-, но и провоспалительных медиаторов и цитокинов. В результате стало понятно, что МСК могут обладать разносторонними иммуномодулирующими свойствами [5]. По нашим данным [2], интактные МСК подавляют антимиkobактериальный иммунный ответ, снижают гранулемогенез и усиливают рост микобактерий, тогда как МСК, стимулированные агонистом TLR3 полуданом, наоборот, формируют провоспалительный фенотип и подавляют размножение бактерий. Очевидно, что роль МСК в гранулематозных инфильтратах может критически зависеть от иммунофенотипа этих клеток, индуцированного микобактериями. Однако непосредственное взаимодействие МСК и микобактерий ранее не изучали. В данной работе исследовали влияние *M. bovis* БЦЖ на формирование иммунофенотипа МСК. Кроме того, изучали, как меняется БЦЖ-индуцированный фенотип МСК под действием полудана. Поскольку антимиkobактериальный иммунный ответ, в том числе ответ на *M. bovis* БЦЖ, критически зависит от реакции Т-клеток, дополнительно выясняли, могут ли БЦЖ-инфицированные МСК изменять жизнеспособность, пролиферативную и апоптотическую активность спленоцитов (преимущественно лимфоциты).

Присутствие провоспалительных цитокинов в очаге воспаления (ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и др.) вызывает в МСК продукцию таких противовоспалительных факторов, как индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО), NO и ПГЕ<sub>2</sub> и др. [4]. Интересно выяснить, каков вклад этих факторов в БЦЖ-МСК взаимодействие и в формирование БЦЖ-индуцированного фенотипа МСК. В наших экспериментах оценивали, каким образом ингибирование продукции ИДО, NO или ПГЕ<sub>2</sub> влияет на БЦЖ-индуцированный ответ МСК, обработанных или не обработанных полуданом.

Цель исследования: охарактеризовать фенотип МСК, формирующийся при их взаимодействии с *M. bovis* БЦЖ, и оценить изменения этого фенотипа под действием ингибиторов и стимуляторов иммунорегуляторной активности.

### Материалы и методы

Использовали вакцину БЦЖ производства ФГБУ «НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» (Москва), полудан производства ООО «Лэнс-Фарм» (Москва), остальные реактивы, если не указано иначе, приобретали в фирме Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO).

МСК выделяли из костного мозга бедренных и большеберцовых костей мышей-самцов BALB/c в возрасте 6-8 нед. Костномозговой материал из-

влекали, строму костного мозга разрушали аспирацией через иглы уменьшающегося диаметра, полученную клеточную суспензию отмывали в охлажденной среде RPMI-1640, ресуспендировали и методом с трипановым синим подсчитывали число жизнеспособных клеток (которая всегда превышала 95%). Далее клетки культивировали при 37°C, 100%-ной влажности в атмосфере с 5%-ным CO<sub>2</sub> в среде RPMI-1640 в присутствии 10%-ной фетальной телячьей сыворотки, 4,0 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина. Неприлипающую фракцию клеток удаляли при смене культуральной среды каждые 3 дня до образования субконфлуэнтного монослоя. Для экспериментов использовали 2-й пассаж клеток. Эти клетки имели типичную для МСК морфологию, не экспрессировали CD45, 100% были CD44<sup>+</sup>, 67% CD73<sup>+</sup>. МСК снимали 0,25%-ным раствором Версен-трипсина (БиолотТ, Россия), отмывали, высаживали в лунки 24-луночного планшета с плотностью 40 000 клеток на лунку и после достижения субконфлуэнтного монослоя к ним добавляли микобактерии БЦЖ и/или полудан и ингибиторы. Всего в планшетах с МСК формировалось 12 экспериментальных групп (в квадриликах): 1-я группа – МСК без добавок; 2-я – МСК + БЦЖ; 3-я – МСК + полудан (П); 4-я – МСК + П + БЦЖ; 5-я – МСК + ингибитор ИДО (1-метилтриптофан, 1-МТ); 6-я – МСК + 1-МТ + БЦЖ; 7-я – МСК + П + 1-МТ; 8-я – МСК + П + 1-МТ + БЦЖ; 9-я – МСК + ингибитор ЦОГ-2 (аркоксиа); 10-я – МСК + аркоксиа + БЦЖ; 11-я – МСК + ингибитор NO (Nw-nitro-L-arginine); 12-я – МСК + Nw-nitro-L-arginine + БЦЖ. БЦЖ добавляли к культуре на 1-е сут перед снятием образцов в количестве 1:5 (200 000 МЕ БЦЖ на лунку), полудан добавляли в дозе 1 мкг/мл, 1-метилтриптофан – 50 мкг/мл, аркоксию (эторикоксиб) – 2 мкмоль/л, Nw-nitro-L-arginine – 27 мкг/мл. После инкубации в течение 24 ч супернатанты снимали и хранили при -70°C не более 1,5 нед. до момента определения содержания цитокинов. Концентрации провоспалительных (ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6) и противовоспалительных (ИЛ-10, ТФР- $\beta$ ) цитокинов в культуральной среде оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов eBioscience серии Platinum, следуя инструкции производителя. Часть супернатантов использовали для определения их влияния на апоптоз и пролиферацию спленоцитов. Для этого спленоциты мышей BALB/c инкубировали в течение 3 сут в супернатантах от МСК, культивированных с БЦЖ. Затем клетки окрашивали пропидиумом йодидом по общепринятой методике. Процентное количество клеток в состоянии апоптоза и S/M-фазе клеточного цикла определяли на точном цитофлуориметре FACS Calibur с использованием программного обеспечения BD CellQuest

## Результаты

Pro. Пролиферативную активность спленоцитов оценивали по инкорпорации 3H-тимидина по Jensen et al. (1981). Статистическую обработку проводили с применением пакета программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки.

Влияние БЦЖ и полудана на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов показано в табл. Как видно из табл., классический иммуносупрессивный фенотип некондиционированных («наивных») МСК под действием БЦЖ кардинально

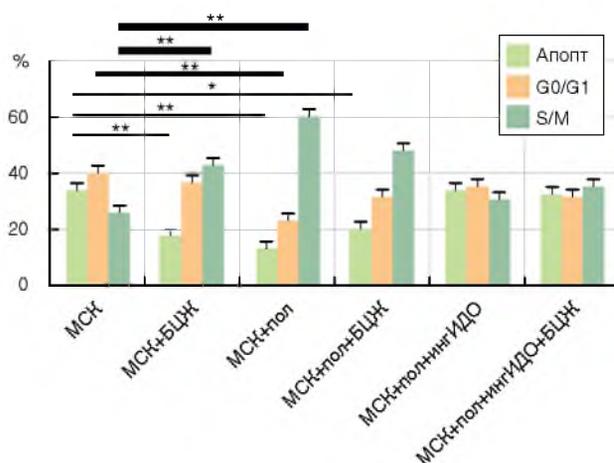
**Таблица. Изменение БЦЖ- и полудан-индуцированной продукции цитокинов мезенхимальными стволовыми клетками в присутствии ингибиторов активности ИДО, ЦОГ-2 и NO синтазы (сравнение с интактными МСК)**

**Table. Changes of BCG- and poludanum-induced production of cytokines by mesenchymal stem cells in the presence of inhibitors of IDO, COG-2 and NO synthase (comparison with intact MSC)**

Цитокины	Экспериментальные группы					
	БЦЖ	БЦЖ + П	БЦЖ + инг. ИДО	БЦЖ + инг. ИДО + П	БЦЖ + инг. ЦОГ-2	БЦЖ + инг. NO
<b>Провоспалительные</b>						
ИЛ-1 $\beta$	↑ в 24,2	↑ в 8,1	↑ в 19,3	↑ в 7,6	↓ в 1,5	↑ в 31,5
ИЛ-6	↑ в 58,1	↑ в 2,3	↑ в 65,5	↑ в 55,8	↑ в 9,8	↑ в 56
ИФН- $\gamma$	↑ в 107,2	↑ в 110,6	↑ в 37,8	↑ в 22,5	-	↑ в 3,9
ФНО- $\alpha$	↑ в 107,7	-	↑ в 61,8	↑ в 130,7	↑ в 91,7	↑ в 243,6
<b>Антивоспалительные</b>						
ТФР- $\beta$	↓ в 1,4	-	↑ в 2,8	↓ в 1,4	↓ в 13,2	↓ в 3,7
ИЛ-10	↓ в 2,1	↓ в 4,9	↑ в 1,3	↑ в 7,4	↓ в 1,4	↓ в 1,8

изменяется и трансформируется в провоспалительный фенотип.

При этом продукция провоспалительных цитокинов драматически возрастает: уровень ИЛ-1 $\beta$  повышается почти в 25 раз, ИЛ-6 – в 60 раз, ИФН- $\gamma$  – более чем в 100 раз. В то же время уровень противовоспалительных цитокинов не повышается, а даже несколько уменьшается: продукция ТФР- $\beta$  снижается в 1,4 раза, ИЛ-10 – в 2,1 раза. Это коррелирует с антиапоптогенной и ростостимулирующей активностью МСК в отношении лимфоцитов (спленоцитов): количество апоптотических спленоцитов при культивировании в супернатанте БЦЖ-обработанных МСК уменьшается почти в 2 раза по сравнению со спленоцитами, культивируемыми в супернатанте от «наивных» МСК. Одновременно количество спленоцитов в фазе S/M (делящиеся) увеличивается в 1,7 раза (рис. 1). Противотуберкулезное значение антиапоптогенной активности Т-клеток хорошо известно [1]. Полученные данные свидетельствуют о способности МСК резко менять свою функциональную поляризацию и о том, что *M. bovis* могут быть эффективными индукторами такой функциональной трансформации. БЦЖ-индуцированная отмена иммуносупрессивного фенотипа МСК и индукция провоспалительного иммуногенного фенотипа, так же как БЦЖ-индуцированная антиапоптогенная и ростостимулирующая активность МСК в отношении лимфоцитов, позволяют думать об антитуберкулезной активности БЦЖ-кондиционированных МСК. Логично предполагать, что вакцинальные и иммуностимулирующие эффекты



**Рис. 1. Действие культуральной среды контрольных или БЦЖ-инфицированных МСК, преинкубированных с полуданом или ингибитором ИДО, на апоптоз и пролиферацию спленоцитов. \* –  $p < 0,01$ , \*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующим контролем**

**Fig. 1. Action of cultured medium of control or BCG-induced MSC pre-incubated with poludanum or IDO inhibitor on apoptosis and splenocytes proliferation. \* –  $p < 0.01$ , \*\* –  $p < 0.001$  compared to the relevant control**

БЦЖ у человека могут опосредоваться, по крайней мере частично, МСК.

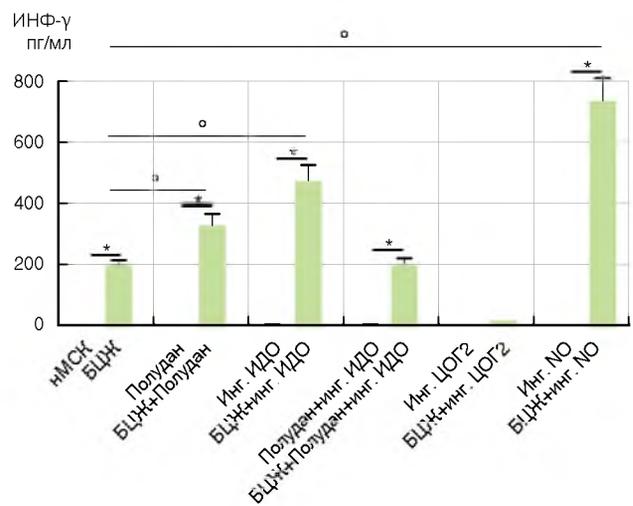
Агонист TLR3 полудан [поли(A:U)], аналог дцРНК, так же как и БЦЖ, в целом меняет функциональный фенотип МСК на провоспалительный. Это видно из небольшого увеличения продукции ИЛ-1 $\beta$ , 25-кратного усиления продукции ИЛ-6 и более чем 100-кратного – ФНО- $\alpha$  при одновременном

3-кратном снижении противовоспалительного цитокина ТФР-β1. Слабый в абсолютном выражении рост продукции ИЛ-10 несколько усложняет, но не меняет картину. Главное отличие влияния полудана от БЦЖ – неспособность стимулировать продукцию ИФН-γ. Однако при совместном действии с БЦЖ полудан отчетливо потенцирует БЦЖ-индуцированную продукцию ИФН-γ, выступая, аналогично вирусной дцРНК, как проинтерфероген. Можно допустить, что так же, как в мононуклеарных фагоцитах, в МСК дцРНК/полудан индуцирует дцРНК-активируемую серин/треонин протеинкиназу PKR, участвующую в транскрипционной регуляции интерферогенеза, продукции ИЛ-6, ФНО-α и ИЛ-10 [3, 8]. Учитывая важность локальной индукции ИФН-γ для сдерживания микобактерий в инфильтрате, а также для формирования вакцинального иммунитета, можно допустить, что использование полудана может оказаться в будущем полезным для формирования антимикобактериальной резистентности. Об этом же свидетельствует тот факт, что, как и в случае с БЦЖ, полудан-индуцированные провоспалительные эффекты ассоциируются с антиапоптогенной и ростостимулирующей активностью МСК в отношении спленоцитов: супернатанты полудан-обработанных МСК уменьшают количество апоптотических спленоцитов по сравнению со спленоцитами, культивированными в супернатанте от покоящихся МСК в 2,5 раза, а количество делящихся клеток увеличивают в 2,3 раза. Очевидно, МСК с провоспалительным фенотипом способствуют формированию резистентности против микобактериальной инфекции.

Свой вклад в цитокиновый профиль МСК, приобретаемый при взаимодействии БЦЖ-МСК (в присутствии или без дцРНК), вносят генерируемые МСК медиаторы, в том числе PGE2, NO и ИДО.

Как показано на рис. 2, БЦЖ-стимулированная продукция ИФН-γ усиливается в присутствии ингибитора генерации NO почти в 4 раза. Это означает, что собственная продукция оксида азота сдерживает БЦЖ-индуцированный интерферогенез. Сходным образом, хотя менее мощно, БЦЖ-индуцированная продукция ИФН-γ потенцируется ингибитором активности ИДО 1-метилтриптофаном (1-МТ), то есть ИДО и/или кинуренины МСК аутокринно препятствуют продукции ИФН-γ. Логично думать, что при иммунотерапевтическом вмешательстве в микобактериальный инфекционный процесс для усиления интерферогенеза можно использовать ингибиторы NO и ИДО. Полудан и 1-МТ при одновременном добавлении в культуру препятствовали стимулирующему действию друг друга и не изменяли БЦЖ-индуцированную продукцию ИФН-γ. Поэтому не исключено, что агонисты TLR3 активируют ИДО и/или продукцию кинуренинов, а ИДО, наоборот, тормозит стимуляцию TLR3.

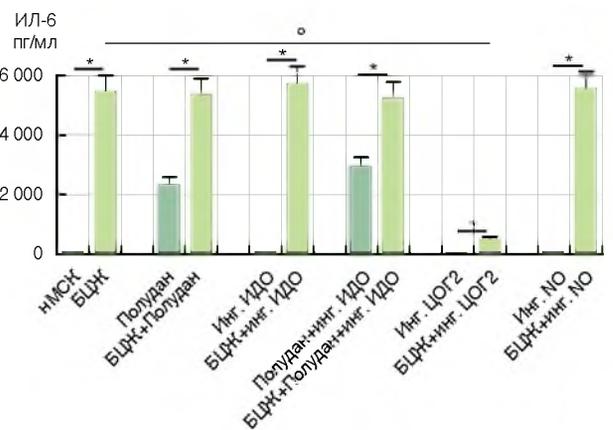
На рис. 3 представлены данные по продукции ИЛ-6, роль которого в противотуберкулезной рези-



**Рис. 2.** Действие полудана и ингибиторов ИДО, ЦОГ-2 и NO на БЦЖ-индуцированную продукцию ИФН-γ. \* –  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующим контролем; ° –  $p < 0,001$  по сравнению с БЦЖ-индуцированным контролем

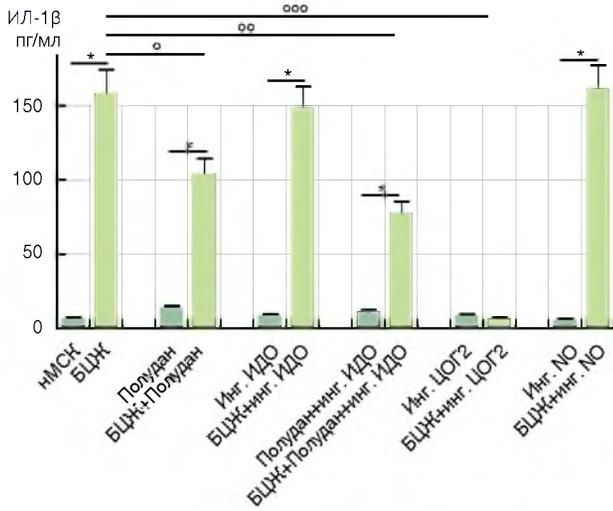
**Fig. 2.** Action of poludanum and inhibitors of IDO, COG-2 and NO on BCG-induced production of IFN-γ. \* –  $p < 0.001$  compared to the relevant control; ° –  $p < 0.001$  compared to BCG-induced control

стентности во многом не определена [11]. Из этих данных следует, что агонист TLR3 сам по себе повышает продукцию ИЛ-6, но не потенцирует БЦЖ-стимулированную продукцию этого цитокина. При этом стимулирующее действие агониста на продукцию ИЛ-6 в нМСК зависит от ИДО незначительно. Обращает на себя внимание зависимость БЦЖ-стимулированной продукции ИЛ-6 от секреции простагландинов, найденная также для ИФН-γ, ИЛ-1β и ТФР-β (рис. 2, 4, 7). По-видимому, БЦЖ-индуцированный рост продукции ИФН-γ,



**Рис. 3.** Действие полудана и ингибиторов ИДО, ЦОГ-2 и NO на БЦЖ-индуцированную продукцию ИЛ-6. \* –  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующим контролем; ° –  $p < 0,001$  по сравнению с БЦЖ-индуцированным контролем

**Fig. 3.** Action of poludanum and inhibitors of IDO, COG-2 and NO on BCG-induced production of IL-6. \* –  $p < 0.001$  compared to compared to the relevant control; ° –  $p < 0.001$  compared to BCG-induced control



**Рис. 4.** Действие полудана и ингибиторов ИДО, ЦОГ-2 и NO на БЦЖ-индуцированную продукцию ИЛ-1 $\beta$ . \* –  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующим контролем; ° –  $p < 0,05$  по сравнению с БЦЖ-индуцированным контролем, °° – то же при  $p < 0,01$ , °°° – то же при  $p < 0,001$

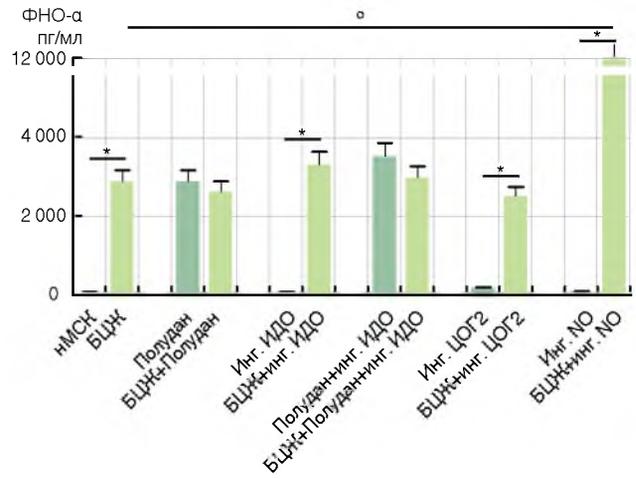
**Fig. 4.** Action of poludanum and inhibitors of IDO, COG-2 and NO on BCG-induced production of IL-1 $\beta$ . \* –  $p < 0,001$  compared to the relevant control; ° –  $p < 0,05$  compared to BCG-induced control, °° – the same by  $p < 0,01$ , °°° – the same by  $p < 0,001$

ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ТФР- $\beta$  в МСК связан с генерацией простагландинов. Агонист TLR3 снижал в 1,5 раза БЦЖ-индуцированную продукцию ИЛ-1 $\beta$ , очевидно, вмешиваясь в инфламмасом-зависимые механизмы секреции ИЛ-1 $\beta$ , а 1-МТ почти не влиял на эту продукцию, тогда как их совместное действие уменьшало ИЛ-1-стимулирующий эффект БЦЖ в 2 раза (рис. 3).

На рис. 5 показано влияние полудана и ингибиторов ИДО, ПГЕ<sub>2</sub> и NO на БЦЖ-индуцируемую продукцию ФНО- $\alpha$ . Наиболее значительный эффект оказывал ингибитор NO, очень мощно стимулировавший продукцию цитокина. Следовательно, БЦЖ способен индуцировать в МСК очень высокий уровень продукции ФНО- $\alpha$ , но, так же как в случае с ИФН- $\gamma$ , эта продукция сдерживается аутокринным влиянием оксида азота.

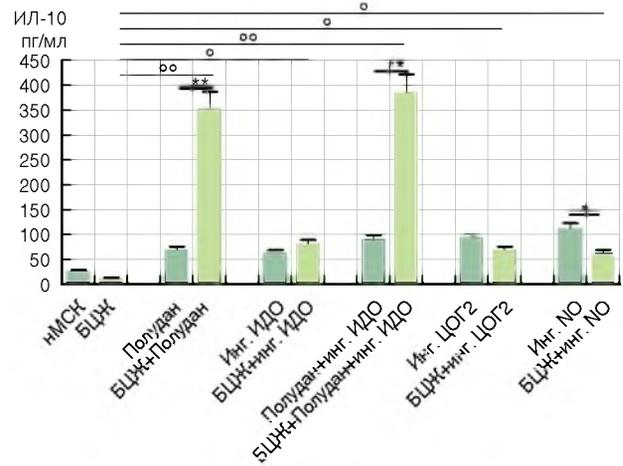
Исходно незначительная продукция ИЛ-10 в БЦЖ-инфицированных МСК, как видно из рис. 6, резко усиливается под действием полудана, добавление к данной системе еще и 1-МТ продукцию ИЛ-10 практически не меняет – она остается на том же значительно повышенном уровне. Поскольку индукция ИЛ-10 включает транскрипционные факторы STAT3, ERK1/2, p38 и NF- $\kappa$ B, можно предполагать, что для активной продукции ИЛ-10 МСК требуется совместная стимуляция TLR2/TLR3.

Базальная/конститутивная продукция ТФР- $\beta$  в МСК, как показано на рис. 7, была довольно высока. Эта продукция, достоверно сниженная в БЦЖ-инфицированных МСК и угнетаемая под действием



**Рис. 5.** Действие полудана и ингибиторов ИДО, ЦОГ-2 и NO на БЦЖ-индуцированную продукцию ФНО- $\alpha$ . \* –  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующим контролем; ° –  $p < 0,001$  по сравнению с БЦЖ-индуцированным контролем

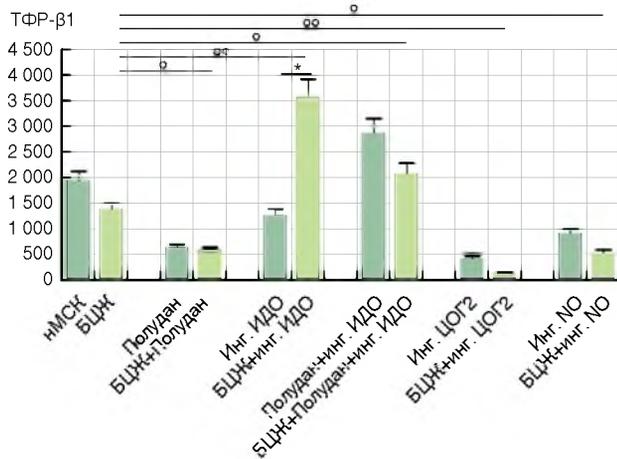
**Fig. 5.** Action of poludanum and inhibitors of IDO, COG-2 and NO on BCG-induced production of TNF- $\alpha$ . \* –  $p < 0,001$  compared to the relevant control; ° –  $p < 0,001$  compared to BCG-induced control



**Рис. 6.** Действие полудана и ингибиторов ИДО, ЦОГ-2 и NO на БЦЖ-индуцированную продукцию ИЛ-10. \* –  $p < 0,01$  по сравнению с соответствующим контролем, \*\* – то же при  $p < 0,001$ ; ° –  $p < 0,01$  по сравнению с БЦЖ-индуцированным контролем, °° – то же при  $p < 0,001$

**Fig. 6.** Action of poludanum and inhibitors of IDO, COG-2 and NO on BCG-induced production of IL-10. \* –  $p < 0,01$  compared to the relevant control; \*\* – the same by  $p < 0,001$ , ° –  $p < 0,01$  compared to BCG-induced control, °° – the same by  $p < 0,001$

полудана, усиливается в несколько раз в присутствии ингибитора ИДО (рис. 7). Такая зависимость оказалась неожиданной, так как активность ИДО, как правило, ассоциирована с толерогенной и противовоспалительной поляризацией клеток [6]. Можно допустить, что повышение продукции ТФР- $\beta$  каким-то образом связано с присутствием внутриклеточной БЦЖ инфекции. Не исключено, что



**Рис. 7.** Действие полудана и ингибиторов ИДО, ЦОГ-2 и NO на БЦЖ-индуцированную продукцию ТФР-β1. \* –  $p < 0,001$  по сравнению с соответствующим контролем; ° –  $p < 0,01$  по сравнению с БЦЖ-индуцированным контролем, °° – то же при  $p < 0,001$

**Fig. 7.** Action of poludanam and inhibitors of IDO, COG-2 and NO on BCG-induced production of TNF-β1. \* –  $p < 0.001$  compared to compared to the relevant control; ° –  $p < 0.01$  compared to BCG-induced control, °° – the same by  $p < 0.001$

полудан и отчасти БЦЖ действуют на продукцию ТФР-β через индукцию ИДО. Ингибирование генерации оксида азота достоверно снижало продукцию ТФР-β, подтверждая известную ассоциацию между генерацией NO и синтезом в МСК ТФР-β [9].

### Заключение

Впервые показано, что микобактериальное инфицирование МСК вызывает их выраженную поляризацию по провоспалительному типу. Кроме того, показано, что кондиционирование клеток агонистом TLR3 (тормозящее, по нашим данным,

рост микобактерий в организме) также индуцирует преимущественно провоспалительный фенотип. Действие полудана на инфицированные клетки приводит к увеличению БЦЖ-индуцированной продукции ИФН-γ и ИЛ-10 и к торможению продукции ТФР-β, тем самым в целом усиливая провоспалительную поляризацию. Очевидно, описанное ранее антимикубактериальное действие полудан-кондиционированных МСК [2] связано с взаимопотенцированием эффектов БЦЖ и полудана. В настоящей работе впервые продемонстрировано, что характер провоспалительного ответа и степень поляризации МСК аутокринно контролируются такими факторами и метаболитами, как ИДО, ЦОГ-2 и NO. Так, активность в клетках ИДО и, по-видимому, кинуренинов, сдерживает БЦЖ-индуцированную секрецию ИФН-γ, ТФР-β и отчасти ФНО-α. Точно так же оксид азота тормозит БЦЖ-стимулированную продукцию ИФН-γ и ФНО-α. ЦОГ-2/простагландины, наоборот, способствуют БЦЖ-индуцированной провоспалительной поляризации МСК. Основываясь на наших данных о выраженной провоспалительной реакции МСК на микобактерии и учитывая способность этих клеток в больших количествах скапливаться в инфильтратах, можно заключить, что МСК – активные участники иммунного ответа на микобактерии. Об этом же свидетельствуют анти-апоптогенное и митоген-стимулирующее действие культуральной жидкости МСК, инкубированных с БЦЖ. Поскольку БЦЖ-индуцированный провоспалительный ответ обеспечивает формирование антимикубактериальной резистентности, можно думать об иммунопротективной роли МСК в этом инфекционном процессе. Не исключено, что в будущем для борьбы с микобактериальной инфекцией или для формирования противотуберкулезного вакцинального иммунитета будет полезно таргетное регулирование продукции ИДО и оксида азота.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Пичугин А. В., Апт А. С. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции // Проб. туб. – 2005. – № 12. – С. 3-7.
2. Шварц Я. Ш., Белгородцев С. Н., Филимонов П. Н., Чередниченко А. Г. Трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальной микобактериальной инфекции: влияние условий кондиционирования // Туб. и болезни легких. – 2015. – Т. 93, № 12. – С. 31-36.
3. Cheung B. K. W., Lee D. C. W., Li J. C. B. et al. Role for double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in Mycobacterium-induced cytokine expression // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175, № 11. – P. 7218-7225.
4. Das B., Kashino S. S., Pulu I. et al. CD271(+) bone marrow mesenchymal stem cells may provide a niche for dormant Mycobacterium tuberculosis // Sci Transl Med. – 2013. – Vol. 5, № 170. – 170ra13.
5. Hawn T. R., Matheson A. I., Maley S. N. et al. Host-directed therapeutics for tuberculosis: can we harness the host? // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2013. – Vol. 77. – P. 608-627.
6. Mándi Y., Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation // J. Neural. Transm. – 2012. Vol. 119, № 2. – P. 197-209.
7. Modlin R. L., Bloom B. R. TB or not TB: That is no longer the question // Sci. Transl. Med. – 2013. Vol. 5, Issue 213. sr6.

### REFERENCES

1. Pichugin A.V., Apt A.S. Cellular apoptosis of the immune system in case of tuberculous infection. Probl. Tub., 2005, no. 12, pp. 3-7. (In Russ.)
2. Shvarts Ya.Sh., Belogorodtsev S.N., Filimonov P.N., Cherednichenko A.G. Transplantation of autologous mesenchymal stem cells in the experimental mycobacterial infection: impact of conditioning. Tub. i Bolezni Legkikh, 2015, vol. 93, no. 12, pp. 31-36. (In Russ.)
3. Cheung B.K.W., Lee D.C.W., Li J.C.B. et al. Role for double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in Mycobacterium-induced cytokine expression. J. Immunol., 2005, vol. 175, no. 11, pp. 7218-7225.
4. Das B., Kashino S.S., Pulu I. et al. CD271(+) bone marrow mesenchymal stem cells may provide a niche for dormant Mycobacterium tuberculosis. Sci. Transl. Med., 2013, vol. 5, no. 170. – 170ra13.
5. Hawn T.R., Matheson A.I., Maley S.N. et al. Host-Directed Therapeutics for Tuberculosis: Can We Harness the Host? Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2013, vol. 77, pp. 608-627.
6. Mándi Y., Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation. J. Neural. Transm., 2012, vol. 119, no. 2, pp. 197-209.
7. Modlin R.L., Bloom B.R. TB or Not TB: That Is No Longer the Question. Sci. Transl. Med., 2013, vol. 5, Issue 213. sr6.

8. Natarajan P, Narayanan S. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv induces monocytic release of interleukin-6 via activation of mitogen-activated protein kinases: inhibition by N-acetyl-L-cysteine // *FEMS Immunol. & Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 50, № 3. – P. 309-318.
9. Pan X., Wang X., Lei W. et al. Nitric oxide suppresses transforming growth factor-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 50, № 5. – P. 1577-1587.
10. Raghuvanshi S., Sharma P., Singh S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – Vol. 107, № 50. – P. 21653-21658.
11. Romero-Adrian T. B., Leal-Montie J., Fernández G., Valecillo A. Role of cytokines and other factors involved in the *Mycobacterium tuberculosis* infection // *World J. Immunol.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 16-50.

## ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» МЗ РФ,  
630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, д. 81а.

**Шварц Яков Шмульевич**  
доктор медицинских наук.  
E-mail: yshschwartz@mail.ru

**Белгородцев Сергей Николаевич**  
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник.  
Тел.: 8 (383) 228-26-73.  
E-mail: s.belogorodtsev@mail.ru

**Петренко Антонина Евгеньевна**  
лаборант-исследователь.  
E-mail: tonya.petrenko1997@gmail.com

ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины»,  
630117, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1.

**Дегтярева Лиана Олеговна**  
E-mail: lia-d94@mail.ru

**Шахмурдова Анастасия Ильхамовна**  
лаборант-исследователь.  
Тел.: 8 (383) 334-83-73.  
E-mail: nshahmuradova@mail.ru

## FOR CORRESPONDENCE:

*Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Russian Ministry  
of Health, 81a, Okhotskaya St., Novosibirsk, 630040*

**Yakov Sh. Shwarts**  
Doctor of Medical Sciences.  
E-mail: yshschwartz@mail.ru

**Sergey N. Belogorodtsev**  
Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher.  
Phone: +7 (383) 228-26-73.  
E-mail: s.belogorodtsev@mail.ru

**Antonina E. Petrenko**  
Laboratory Researcher.  
E-mail: tonya.petrenko1997@gmail.com

*Research Institute of Therapy and Preventive Medicine,  
175/1, Borisa Bogatkova St., Novosibirsk, 630117*

**Liana O. Degtyareva**  
E-mail: lia-d94@mail.ru

**Anastasia I. Shakhmuradova**  
Laboratory Researcher.  
Phone: +7 (383) 334-83-73.  
E-mail: nshahmuradova@mail.ru

Поступила 12.07.2016

Submitted as of 12.07.2016