

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА**CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE**

УДК 576.54:57.085.23

Поступила в редакцию 16.08.2017

Received 16.08.2017

Н. Г. Антоневи́ч¹, А. Е. Гончаров¹, О. В. Буши́к¹, Е. Г. Рында¹, В. Л. Чекан², Э. А. Стринкеви́ч²

¹Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь

²Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования,
Минск, Республика Беларусь

**ПОДАВЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ CD8⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ
И ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ
КЛЕТКАМИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ПОЛОСТИ НОСА**

Аннотация. В работе изучены иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки (МСК ОВ) полости носа человека в отношении функциональной активности цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и естественных киллерных клеток (ЕКК) – клеточно-опосредованной цитотоксичности. Впервые показано, что иммуномодулирующий эффект МСК ОВ на ЦТЛ и ЕКК проявляется в подавлении механизмов реализации цитотоксической функции (снижении продукции перфорина и гранзима В, уменьшении экспрессии CD107a), что снижает способность эффекторных клеток уничтожать клетки-мишени. Полученные данные могут быть использованы при разработке биомедицинских клеточных продуктов на основе МСК ОВ для лечения заболеваний, в иммунопатогенезе которых ведущая роль принадлежит цитотоксической активности ЦТЛ и ЕКК.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, обонятельная выстилка, цитотоксичность, Т-лимфоциты, естественные киллерные клетки

Для цитирования: Подавление цитотоксической функции CD8⁺ Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток мезенхимальными стволовыми клетками обонятельной выстилки полости носа / Н. Г. Антоневи́ч [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 7–16.

N. H. Antonevich¹, A. Y. Hancharou¹, O. V. Buschik¹, A. G. Rynda¹, V. L. Chekan², E. A. Strinkevich²

¹Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

**SUPPRESSION OF CD8⁺ T-LYMPHOCYTES AND NATURAL KILLER CELLS CYTOTOXIC FUNCTION
BY HUMAN OLFACTORY MUCOSA-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS**

Abstract. In this study, the immunomodulatory effects of human olfactory mucosa-derived stem cells (hOM-MSCs) against the cell-mediated cytotoxic activity of cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) and natural killer cells (NKC) are evaluated. It has been shown that the immunomodulatory activity is realized through a suppression of cytotoxic mechanisms (decrease in the expression of perforin, granzyme B, CD107a), which eventually leads to a reduced ability to induce apoptosis in target tumor cells. The obtained results can be applied for development of biomedical cell products based on hOM-MSCs to treat diseases in which the leading role is played by the cytotoxic activity of CTL and NKCs.

Keywords: mesenchymal stem cells, olfactory mucosa, cytotoxicity, T-lymphocytes, natural killer cells

For citation: Antonevich N. H., Hancharou A. Y., Buschik O. V., Rynda A. G., Chekan V. L., Strinkevich E. A. Suppression of CD8⁺ T-lymphocytes and natural killer cells cytotoxic function by human olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 7–16. (in Russian).

Введение. В настоящее время биомедицинские клеточные продукты (БМКП) на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК) активно используются в качестве альтернативных и/или дополнительных лечебных средств в профилактике и терапии ряда тяжелых заболеваний, имеющих в основе иммунологические нарушения.

МСК, полученные из различных тканевых источников, характеризуются рядом общих функциональных свойств, которые обуславливают терапевтический эффект при их трансплантации. МСК проявляют иммуномодулирующую активность в отношении различных звеньев клеточного и гуморального иммунитета; продуцируют широкий спектр факторов роста, цитокинов, белков внеклеточного матрикса, посредством чего оказывают трофический, проапоптотический, ангиостимулирующий и другие локальные эффекты. Несмотря на то что МСК разного тканевого происхождения в целом схожи между собой, спектр их иммуотропного и паракринного эффектов, а также степень выраженности последних различаются [1].

Перспективными БМКП являются МСК, выделенные из соединительнотканной подложки обонятельной выстилки (ОВ) средних и верхних носовых ходов [2]. Получение БМКП на основе МСК привлекает своей атравматичностью, хорошей переносимостью при заборе биоматериала, а также простотой и дешевизной выделения и культивирования клеток. К настоящему времени методы накопления биомассы МСК ОВ [3] оптимизированы, а клетки используются для проведения клинических испытаний метода лечения хронических стенозов трахеи и гортани (NCT03130374 в международной базе данных о проводимых клинических исследованиях и их результатах – <https://clinicaltrials.gov>). В перспективе планируется оценка эффективности МСК ОВ в лечении аутоиммунных заболеваний. Полученные нами ранее результаты изучения влияния МСК ОВ на иммунофенотип и функциональные свойства Т-клеток и антигенпредставляющих клеток показали, что МСК ОВ оказывают иммуносупрессивный эффект на пролиферацию Т-лимфоцитов [4], индуцируют дифференцировку дендритных клеток в толерогенном направлении [5], стимулируют формирование у макрофагов противовоспалительного иммунофенотипа [6]. Также известно, что МСК ОВ оказывают иммуносупрессивный эффект на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК) [7], подавляют дифференцировку Т-регуляторных лимфоцитов (Трег) [8, 9], функцию эозинофилов [10]. В то же время отсутствуют данные о влиянии МСК ОВ на функциональную активность цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и ЕКК.

Известно, что МСК из других источников способны оказывать модулирующий эффект на ЦТЛ и ЕКК. Изучение влияния МСК из костного мозга, жировой ткани (ЖТ) и пупочного канатика показало, что все три типа МСК подавляют активацию $CD8^+$ Т-лимфоцитов и ЕК-клеток, причем МСК ЖТ оказывают наиболее выраженный иммуносупрессивный эффект [1]. Под влиянием МСК у ЕКК снижалась экспрессия фактора некроза опухолей- α , других цитокинов, перфорина, подавлялась пролиферация и цитотоксическая функция [1, 11]. При клеточной терапии посттрансплантационных осложнений МСК могут оказывать благоприятный клинический эффект за счет генерации $CD8^+$ регуляторных клеток Трег [12]. В то же время есть риск, что МСК могут способствовать прогрессированию онкологических заболеваний за счет подавления функции цитотоксических клеток. При сокультивировании МСК, линии клеток рака молочной железы и мононуклеаров периферической крови (МПК) наблюдался протекторный эффект МСК в отношении опухолевых клеток. Под влиянием МСК происходило образование Трег, ингибирование пролиферации и продукции гранзима В у ЦТЛ [13]. Проводились исследования влияния МСК на Т-клеточный ответ при воздействии вирусных патогенов. Показано, что МСК оказывают слабое влияние на пролиферацию антиген-специфичных ЦТЛ, специфичных к вирусам Эпштейн–Барра и цитомегаловируса. ЦТЛ сохраняли способность к продукции интерферона- γ и цитотоксическую активность [14].

Цель данного исследования – оценить влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки полости носа человека на цитотоксическую функцию цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток общей фракции мононуклеаров периферической крови при их сокультивировании.

Объекты и методы исследования. *Получение МСК ОВ.* Образцы ткани ОВ среднего носового хода забирали у пациентов с диагнозом хронический стеноз трахеи и/или гортани (J38.6 и J95.5 по МКБ-10) с их информированного согласия (РНПЦ оториноларингологии). Культуры МСК ОВ ($n = 3$) получали методом эксплантов [2]. Соответствие клеток критериям МСК оценивали согласно общепринятым международным рекомендациям [15].

Выделение МПК осуществляли методом градиентного центрифугирования [4].

В качестве опухолевых клеток-мишеней использовали суспензионную перевиваемую клеточную линию Jurkat (человек, Т-лимфобластный лейкоз) из Коллекции культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии [16, 17].

Условия сокультивирования МСК ОБ и МПК. При постановке эксперимента в различных комбинациях использовали три культуры МСК ОБ и МПК, выделенные из крови 6 доноров. За сутки до сокультивирования высевали культуры МСК ОБ в концентрации 20 тыс. клеток/см² в 2 мл ростовой среды на 12-луночные планшеты. На следующие сутки после образования монослоя МСК ОБ с конфлюентностью 70–80 % из лунки удаляли 1 мл ростовой среды и вносили туда 1 мл суспензии МПК (соотношение МСК и МПК 1 : 10). В качестве контроля использовали МПК без присутствия МСК. Каждый вариант выполняли в двух повторах. Культивирование клеток осуществляли в ростовой среде α -МЕМ с добавлением 10 %-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 50 мкг/мл гентамицина в CO₂-инкубаторе (37 °С, 5 % CO₂ и влажности воздуха 95 %) на протяжении 3 сут.

Постановка цитотоксических тестов. После сокультивирования МПК отмывали путем центрифугирования, суспендировали в свежей ростовой среде в концентрации 1 млн клеток/мл и вносили 1 мл суспензии в лунку 12-луночного планшета. Затем в каждую лунку добавляли 1 мл суспензии клеток-мишеней в концентрации 200 тыс/мл (соотношение МПК и Jurkat 5 : 1). В качестве контролей использовали отдельно клетки Jurkat и МПК. Клетки инкубировали в течение 2 ч, затем оценивали количество некротических и апоптотических клеток линии Jurkat, анализировали уровень экспрессии молекулы CD107a на поверхности ЦТЛ и ЕКК из общей фракции МПК. Для анализа внутриклеточного содержания перфорина и гранзима у ЦТЛ и ЕКК за 20 мин до добавления суспензии Jurkat в лунки с МПК вносили монензин в конечной концентрации 10 мкг/мл для ингибирования трансмембранного транспорта, добавляли клетки-мишени и инкубировали их в течение 2 ч. В качестве контролей использовали культуры МПК с добавлением монензина, но без добавления клеток линии Jurkat.

Определение поверхностных маркеров, жизнеспособности и апоптоза клеток. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием антител к молекулам CD3, CD8, CD16, CD90, CD107a, перфорину, гранзиму В. Жизнеспособность оценивали с помощью зондов Annexin V и TO-PRO-3. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Biosciences, США). Учитывали как содержание позитивных по исследуемому маркеру клеток (процент экспрессии), так и среднюю интенсивность флуоресценции, которая отражает число молекул (в усл. ед.) на клетку. Для анализа данных использовали программу Weasel версии 3.3 (WENI, Австралия).

Методы статистической обработки данных. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программ Statistica версии 12 и StatPlus 2007 Professional (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах. Для сравнения выборок использовали непараметрические методы: U-критерий Манна–Уитни и W-критерий Вилкоксона. В качестве критерия достоверности различий между показателями принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Влияние МСК на продукцию цитолитических белков Т-лимфоцитами и ЕК-клетками. Основным способом реализации цитотоксичности является гранзим-перфориновый механизм. После активации клетками-мишенями у эффекторных клеток осуществляются транспорт цитолитических гранул к клеточной мембране, а затем их дегрануляция. Секретируемый белок перфорин формирует поры в мембране клеток-мишеней, и основные цитолитические белки гранзимы (сериновые протеазы) через поры попадают в цитоплазму, индуцируют каспазный каскад и запускают механизм апоптоза [18]. Таким образом, первой задачей исследования стало изучение влияния МСК ОБ на экспрессию белков перфорина и гранзима В у ЦТЛ и ЕКК.

При анализе контрольных культур МКП в популяции ЦТЛ число гранзим-позитивных клеток составляло 19,9 (10,0–25,7) % при средней интенсивности экспрессии белка 202,5 (84,0–270,0) усл. ед. на клетку. Число ЦТЛ, продуцирующих перфорин, составило 5,9 (3,2–8,1), интенсивность экспрессии – 7,7 (6,7–8,5) усл. ед. на клетку. При анализе культур МПК, сокультивированных с МСК ОБ, экспрессия перфорина и гранзима В в популяции ЦТЛ и число позитивных клеток достоверно не изменились.

При анализе популяции ЕКК в контрольных культурах МПК выявлено более 90 % гранзим- и перфорин-позитивных клеток. МСК ОБ не оказывали достоверного влияния на количество ЕКК, продуцирующих перфорин и гранзим В.

В то же время установлено достоверное снижение накопления гранзима В и перфорина в цитоплазме ЕКК после сокультивирования с МСК ОБ. Интенсивность экспрессии гранзима В в контрольных культурах составила 667,5 (401,0–747,0) усл. ед. на клетку, а после сокультивирования с МСК ОБ – 340,0 (290,0–466,0) усл. ед. на клетку ($p = 0,03$). Также достоверно снизилась экспрессия перфорина: в контрольных культурах она составила 47,6 (42,3–58,0) усл. ед. на клетку, после сокультивирования с МСК – 31,6 (29,8–33,6) усл. ед. ($p = 0,03$) (рис. 1).

Известно, что перфорин и гранзимы экспрессируются ЕКК конститутивно, в то время как у ЦТЛ базальная продукция белка выражена слабее и индуцируется после контакта с клеткой-мишенью [18].

Экспрессия CD107a ЦТЛ и ЕКК при сокультивировании с МСК ОБ. Следующим этапом работы стало изучение влияния МСК ОБ на экспрессию в популяциях ЦТЛ и ЕКК молекулы CD107a – маркера активации/дегрануляции. Молекула CD107a (ассоциированный с лизосомами мембранный протеин 1 – LAMP-1) совместно с перфорином локализована в секреторных гранулах ЕКК и ЦТЛ. В результате дегрануляции во внешнюю среду выделяются цитотоксические белки, а мембранный белок лизосом CD107a остается на внешней стороне цитоплазматической мембраны [19]. Таким образом, по интенсивности поверхностной экспрессии CD107a и числу позитивных клеток можно судить о эффективности активации ЕКК и ЦТЛ.

Так, в контрольных культурах МПК выявлено 0,9 (0,8–1,0) % CD8⁺CD107a⁺ ЦТЛ, а среди ЕКК доля клеток CD8⁺CD107a⁺ составила 2,1 (1,8–2,5) %. Сокультивирование с МСК ОБ приводило к практически полному подавлению спонтанной дегрануляции у эффекторных клеток, доля CD107a⁺ у ЦТЛ и ЕКК составила 0,45 (0,40–0,60) и 0,50 (0,40–0,60) % соответственно ($p = 0,03$).

При контакте контрольных МПК с клетками-мишенями происходила стимуляция дегрануляции, достоверно увеличивалось количество CD107a⁺ ЦТЛ и ЕКК – до 3,55 (2,8–5,8) и 3,30 (3,00–3,50) % соответственно ($p = 0,03$).

После сокультивирования МСК ОБ и МПК у ЦТЛ и ЕКК при стимуляции клетками Jurkat сохранялась способность к дегрануляции, но была достоверно ниже, чем у эффекторных клеток, культивированных без МСК ОБ. В МСК ОБ-индуцированных культурах содержание CD107a⁺ ЦТЛ и ЕКК составило 1,85 (1,5–2,3) и 1,7 (1,40–1,80) % соответственно ($p = 0,03$). Результаты сравнения 4 групп клеток представлены на рис. 2.

Таким образом, установлено, что сокультивирование МПК с МСК ОБ приводит к подавлению спонтанной и стимулированной поверхностной экспрессии белка CD107a в популяциях ЦТЛ и ЕКК.

Влияние МСК на цитотоксическую активность эффекторных клеток фракции МПК в отношении клеток-мишеней. Один из первых методов оценки клеточно-опосредованной цитотоксичности – тест на высвобождение в культуральную среду изотопа ⁵¹[Cr] из клеток-мишеней, предварительно маркированных радиоактивным Na₂Cr₂O₄ [20]. Высвобождение хрома происходит после гибели клеток вследствие нарушения целостности мембраны. К недостаткам данного метода можно отнести спонтанное высвобождение изотопа, работу с потенциально опасными радиоактивными веществами, использование специализированного оборудования.

Кроме того, применяются разнообразные ELISA тест-системы по выявлению количества IFN- γ , лактатдегидрогеназы, гранзима В и других веществ в супернатанте, которые позволяют лишь косвенно оценить цитотоксичность [21–25]. Наиболее точными и информативными являются методы, основанные на непосредственном учете количества мертвых и живых клеток-мишеней после сокультивирования с CD8⁺ ЦТЛ и/или ЕКК.

В данном исследовании использован точный, относительно простой и быстрый в исполнении метод на основе проточной цитометрии, адаптированный для теста цитотоксичности [26–28]. В качестве клеток-мишеней выбрана перевиваемая линия Jurkat, полученная от пациента, страдавшего Т-лимфобластным лейкозом. Предыдущие исследования показали, что клетки Jurkat характеризуются высокой экспрессией молекулы CD90 [16, 17], в то же время эта молекула практически не экспрессируется клетками периферической крови. Таким образом, после сокультивиро-

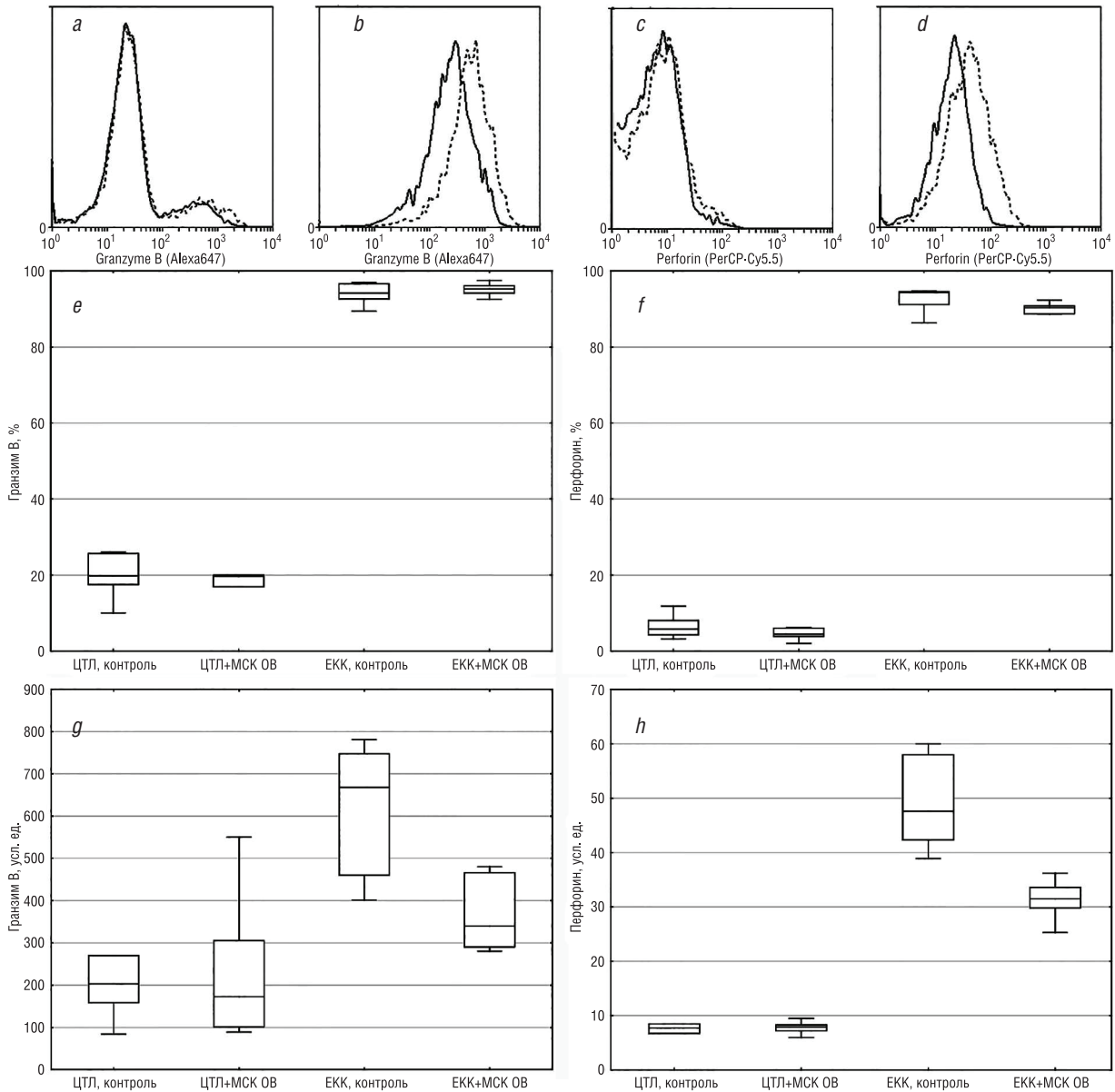


Рис. 1. Экспрессия перфорины и гранзима В в популяциях ЦТЛ и ЕКК при культивировании в присутствии и без МСК ОВ: гистограммы флуоресценции *a, c* – ЦТЛ; *b, d* – ЕКК, где непрерывной линией обозначена экспрессия под влиянием МСК ОВ и пунктирной – отрицательный контроль; *e* – содержание клеток, продуцирующих гранзим В; *f* – содержание клеток, продуцирующих перфорин; *g* – средняя интенсивность флуоресценции гранзима В; *h* – средняя интенсивность флуоресценции перфорины

Fig. 1. Expressions of perforin and granzyme B by cytotoxic T-lymphocytes and natural killer cells cultured alone and with olfactory mucosa derived mesenchymal stem cells: the histograms *a, c* – cytotoxic T-lymphocytes; *b, d* – natural killer cells, the continuous line indicates expression after culture with olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells; the dotted line indicates negative control; *e* – content of granzyme B⁺ cells; *f* – perforin⁺ cells; *g* – mean fluorescence intensity of granzyme B; *h* – mean fluorescence intensity of perforin

вания с МПК клетки Jurkat удобно гейтировать как CD90⁺-клетки и анализировать содержание апоптотических и некротических клеток по стандартной методике с применением зондов и ин-теркалирующих красителей. Использование CD90⁺ Jurkat позволяет избежать предварительного окрашивания клеток-мишеней витальными красителями (например, CFSE) для последующей идентификации в смешанной культуре с эффекторными клетками, как это принято при работе с другими опухолевыми линиями [27, 28].

Анализ полученных результатов показал, что в контрольных культурах Jurkat доля некротических клеток составила 2,3 (1,7–2,9) %, апоптотических – 4,0 (3,8–4,7) %. После инкубирования

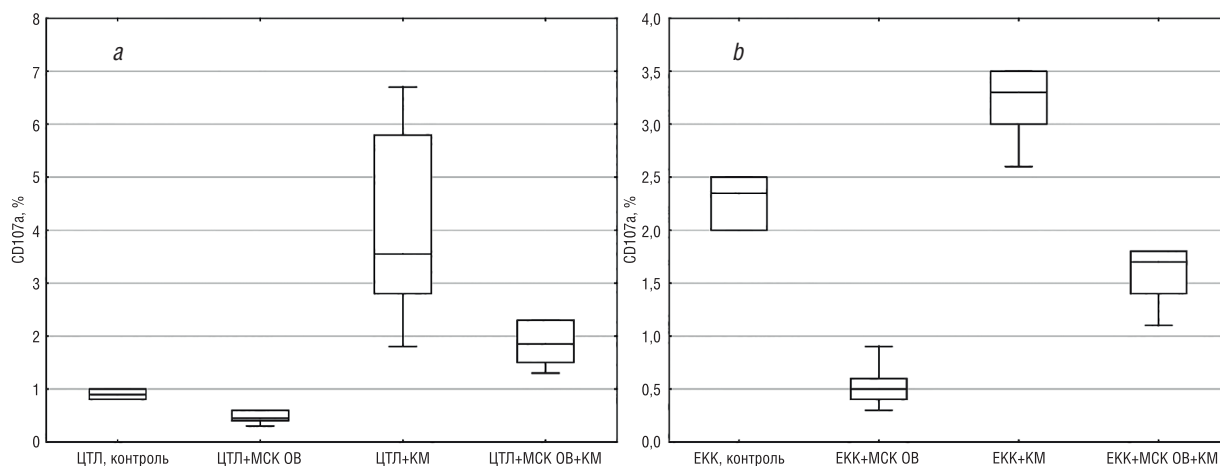


Рис. 2. Поверхностная экспрессия маркера дегрануляции CD107a ЦТЛ (a) и ЕКК (b) в различных условиях культивирования (KM – клетки-мишени Jurkat)

Fig. 2. Surface expression of CD107a degranulation marker by cytotoxic T-lymphocytes (a) and natural killer cells (b) cultured alone and with olfactory mucosa derived mesenchymal stem cells (TC – Jurkat target-cells)

клеток-мишеней с контрольными МПК содержание мертвых клеток достоверно возросло, но оставалось в пределах 2,85 (2,8–3,0) % ($p = 0,027$), в то же время доля клеток, вступивших в апоптоз, составила 22,2 (18,2–27,3) %. Таким образом, в смешанной культуре МПК и Jurkat в течение 2 ч происходит индукция начальных этапов клеточно-опосредованной цитотоксичности клеток-мишеней (рис. 3).

Для изучения влияния МСК ОВ на функциональную активность эффекторных клеток проводили сокультивирование МПК и МСК ОВ на протяжении 3 сут и анализировали способность МПК вызывать цитотоксичность. В результате анализа жизнеспособности клеток Jurkat установлено, что МСК ОВ-индуцированные МПК также оказывают цитотоксический эффект на опухолевые клетки: некроз составил 3,0 (2,4–3,9) %, апоптоз – 13,3 (12,0–15,4) %. В то же время при сравнении функциональной активности контрольных и МСК ОВ-стимулированных МПК установлено, что уровень апоптоза клеток Jurkat при контакте с МСК ОВ-стимулированными МПК был достоверно ниже ($p = 0,03$), а количество некротических опухолевых клеток в культурах достоверно не различалось (рис. 3).

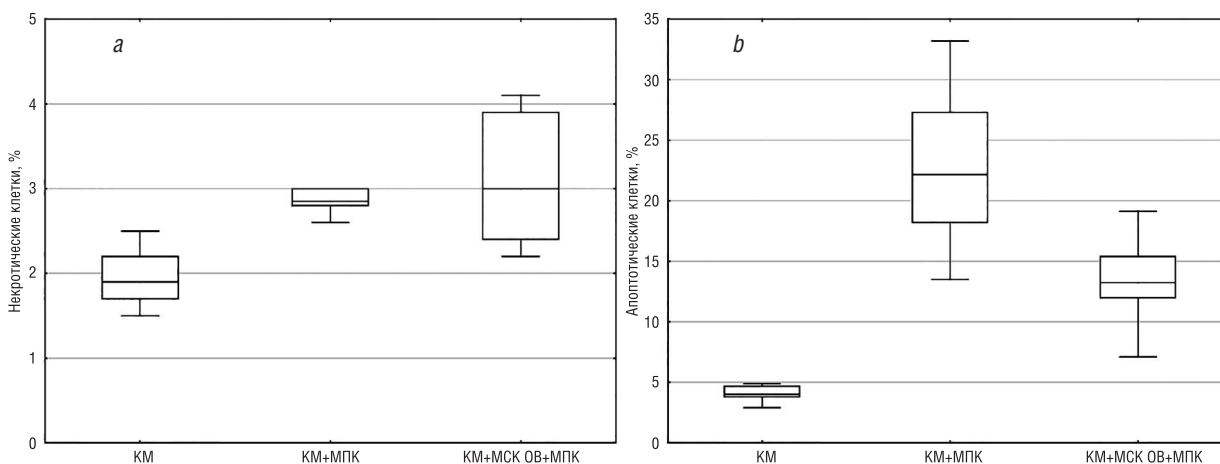


Рис. 3. Цитотоксическая активность клеток общей фракции МПК, культивированных в различных условиях, в отношении клеток-мишеней (KM) (a – содержание некротических KM линии Jurkat; b – содержание апоптотических KM линии Jurkat)

Fig. 3. Cytotoxic activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultured in different conditions in relation to the Jurkat target cells (a – content of necrotic Jurkat cells; b – content of apoptotic Jurkat cells)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что МСК ОБ-стимулированные эффектор-ные клетки общей фракции МПК характеризуются сниженной способностью вызывать апоптоз клеток-мишеней линии Jurkat.

Заключение. В работе впервые изучены иммуномодулирующие свойства МСК ОБ в отношении специфической функциональной активности ЦТЛ и ЕК-клеток – клеточно-опосредованной цитотоксичности. Дана оценка разным аспектам проявления ЦТЛ и ЕКК цитотоксических свойств: накоплению белков, задействованных в механизмах киллинга, и индукции апоптоза/некроза опухолевых клеток-мишеней (конечный эффект).

Показано, что под влиянием МСК ОБ у ЕК-клеток снижается продукция цитотоксических эффекторных молекул: гранзима В – в 2 раза, перфорина – в 1,5 раза. В то же время МСК ОБ не оказывают выраженного влияния на экспрессию перфорина и гранзима В ЦТЛ.

Установлено, что МСК ОБ при сокультивировании практически полностью подавляют у ЦТЛ и ЕК-клеток спонтанную дегрануляцию, оцениваемую по экспрессии маркера CD107a. После сокультивирования с МСК ОБ уровень индуцированной дегрануляции (клетки-мишени Jurkat) у ЦТЛ и ЕК-клеток также достоверно ниже, чем в контрольных культурах.

Выявлена сниженная способность МСК ОБ-индуцированных МПК вызывать апоптоз у опухолевых клеток-мишеней линии Jurkat.

Таким образом, иммуномодулирующий эффект МСК ОБ в отношении ЦТЛ и ЕКК в общей фракции МПК проявляется в подавлении механизмов реализации цитотоксической функции, что приводит к снижению способности эффекторных клеток уничтожать клетки-мишени.

Полученные данные могут быть использованы при разработке БМКП на основе МСК ОБ для лечения заболеваний, в иммунопатогенезе которых ведущая роль принадлежит цитотоксической активности ЦТЛ и ЕКК, например, для предотвращения отторжения трансплантата. В то же время, на наш взгляд, описанные свойства следует учитывать при применении МСК ОБ у пациентов, страдающих онкозаболеваниями и хроническими инфекциями.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells / A. Ribeiro [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2013. – Vol. 4, N 5. – P. 125.
2. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties / V. Delorme [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2010. – Vol. 19, N 6. – P. 853–866.
3. Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки носовой полости человека / Н.Г. Антонец [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2015. – № 1. – С. 42–49.
4. Антонец, Н.Г. Иммуносупрессивные свойства культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия человека / Н.Г. Антонец, А.Е. Гончаров, В.Л. Чекан // *Здравоохранение.* – 2014. – № 10. – С. 14–19.
5. Гончаров, А.Е. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки на антигенный профиль дендритных клеток / А.Е. Гончаров, Н.Г. Антонец, В.Л. Чекан // *Новости мед.-биол. наук.* – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 102–106.
6. Антонец, Н.Г. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека на дифференцировку макрофагов *ex vivo* / Н.Г. Антонец, А.Е. Гончаров // *Современные проблемы инфекционной патологии человека* : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии ; под ред. Л.П. Титова. – Электрон. текстовые дан. – Минск, 2016. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM). – Вып. 9. – С. 185–190.
7. Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues / M. Di Trapani [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22, N 22. – P. 2990–3002.
8. Olfactory ecto-mesenchymal stem cells possess immunoregulatory function and suppress autoimmune arthritis / K. Rui [et al.] // *Cell Mol. Immunol.* – 2016. – Vol. 13, N 3. – P. 401–408.
9. IL-17 down-regulates the immunosuppressive capacity of olfactory ecto-mesenchymal stem cells in murine collagen-induced arthritis / J. Tian [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, N 28. – P. 42953–42962.
10. Nasal mucosa derived-mesenchymal stem cells from mice reduce inflammation via modulating immune responses / C. Yang [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, N 3. – P. e0118849.
11. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells / P.A. Sotiropoulou [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24, N 1. – P. 74–85.
12. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction / C. Prevosto [et al.] // *Haematologica.* – 2007. – Vol. 92, N 7. – P. 881–888.
13. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta / S.A. Patel [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184, N 10. – P. 5885–5894.

14. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses / H. Karlsson [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112, N 3. – P. 532–541.
15. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement / M. Dominici [et al.] // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8, N 4. – P. 315–317.
16. Коллекция культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии: нынешнее состояние и перспективы развития / С. В. Корень [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека* : сб. науч. ст. – Минск, 2015. – Вып. 8. – С. 162–168.
17. Hancharou, A. Y. Comparative profile of surface and intracellular molecule expression in 10 immortalized human T cell lines to be considered for immunomodulatory drug evaluations / A. Y. Hancharou, E. V. Duzh, L. M. DuBuske // *Allergy*. – 2016. – Vol. 71, suppl. 102. – P. 187.
18. Janeway, C. T-cell mediated immunity / C. Janeway // *Janeway's Immunobiology* / K. Murphy, P. Travers, M. Walport. – New York, 2017. – Ch. 9. – P. 345–395.
19. Alter, G. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity / G. Alter, G. M. Malenfant, M. Altfeld // *J. Immunol. Methods*. – 2004. – Vol. 294, N 1/2. – P. 15–22.
20. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs / K. T. Brunner [et al.] // *Immunology*. – 1968. – Vol. 14, N 2. – P. 181–196.
21. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN γ -ELISpot assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial / C. Scheibenbogen [et al.] // *J. Immunol. Methods*. – 2000. – Vol. 224, N 1/2. – P. 81–89.
22. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISpot assay / A. Schmittel [et al.] // *J. Immunother.* – 2000. – Vol. 23, N 3. – P. 289–295.
23. Correlation of human CD56⁺ cell cytotoxicity and IFN- γ production / E. G. Derby [et al.] // *Cytokine*. – 2001. – Vol. 13, N 2. – P. 85–90.
24. Granzyme B ELISPOT assay for ex vivo measurements of T cell immunity / F. H. Rininsland [et al.] // *J. Immunol. Methods*. – 2000. – Vol. 240, N 1/2. – P. 143–155.
25. Application of the granzyme B ELISPOT assay for monitoring cancer vaccine trials / K. Shafer-Weaver [et al.] // *J. Immunother.* – 2006. – Vol. 29, N 3. – P. 328–335.
26. Maecker, H. T. Multiparameter flow cytometry monitoring of T cell responses / H. T. Maecker // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 485. – P. 375–391.
27. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity / L. Zaritskaya [et al.] // *Expert Rev. Vaccines*. – 2010. – Vol. 9, N 6. – P. 601–616.
28. Noto, A. Cell-based flow cytometry assay to measure cytotoxic activity / A. Noto, P. Nqauv, L. Trautmann // *J. Vis. Exp.* – 2013. – N 82. – P. e51105.

References

1. Ribeiro A., Laranjeira P., Mendes S., Velada I., Leite C., Andrade P., Santos F., Henriques A., Grãos M., Cardoso C. M., Martinho A., Pais M., da Silva C. L., Cabral J., Trindade H., Paiva A. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 2013, vol. 4, no. 5, pp. 125. DOI: 10.1186/scrt336
2. Delorme B., Nivet E., Gaillard J., Häupl T., Ringe J., Deveze A., Magnan J., Sohler J., Khrestchatskiy M., Roman F. S., Charbord P., Sensebe L., Layrolle P., Feron F. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells and Development*, 2010, vol. 19, no. 6, pp. 853–866. DOI: 10.1089/scd.2009.0267
3. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Chekan V. L., Sidorenko I. V., Kvacheva Z. B. Immunophenotypic characteristics of human nasal olfactory mesenchymal stem cells. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2015, no. 1, pp. 42–49 (in Russian).
4. Antonevich N. G., Goncharov A. E., Chekan V. L. Immunosuppressive properties of cultured ectomesenchymal stem cells of human olfactory epithelium. *Zdravoohranenie [Healthcare]*, 2014, no. 10, pp. 14–19 (in Russian).
5. Goncharov A. E., Antonevich N. G., Chekan V. L. Effect of human nasal olfactory mesenchymal stem cells on the antigenic profile of dendritic cells. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk [News of Biomedical Sciences]*, 2015, vol. 10, no. 3, pp. 102–106 (in Russian).
6. Antonevich N. G., Goncharov A. E. Effect of mesenchymal stem cells of the olfactory lining of the human on the differentiation of macrophages *ex vivo*. *Sovremennye problemy infekcionnoj patologii cheloveka [Modern problems of human infectious pathology]*, Ministry of Health of the Republic of Belarus, the Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, in Titov L. P. (ed.), electronic text dan, 1 electronic optical disk (DVD-ROM). Minsk, 2016, iss. 9, pp. 185–190 (in Russian).
7. Di Trapani M., Bassi G., Ricciardi M., Fontana E., Bifari F., Pacelli L., Giacomello L., Pozzobon M., Féron F., De Coppi P., Anversa P., Fumagalli G., Decimo I., Menard C., Tarte K., Krampera M. Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues. *Stem Cells and Development*, 2013, vol. 22, no. 22, pp. 2990–3002. DOI: 10.1089/scd.2013.0204
8. Rui K., Zhang Z., Tian J., Lin X., Wang X., Ma J., Tang X., Xu H., Lu L., Wang S. Olfactory ecto-mesenchymal stem cells possess immunoregulatory function and suppress autoimmune arthritis. *Cellular and Molecular Immunology*, 2016, vol. 13, no. 3, pp. 401–408. DOI: 10.1038/cmi.2015.82

9. Tian J., Rui K., Tang X., Wang W., Ma J., Tian X., Wang Y., Xu H., Lu L., Wang S. IL-17 down-regulates the immunosuppressive capacity of olfactory ecto-mesenchymal stem cells in murine collagen-induced arthritis. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, no. 28, pp. 42953–42962. DOI: 10.18632/oncotarget.10261
10. Yang C., Li J., Lin H., Zhao K., Zheng C. Nasal mucosa derived-mesenchymal stem cells from mice reduce inflammation via modulating immune responses. *PLoS One*, 2015, vol. 20, no. 11–12, p. e0118849. DOI: 10.1371/journal.pone.0118849
11. Sotiropoulou P. A., Perez S. A., Gritzapis A.D., Baxevas C. N., Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 2006, vol. 24, no. 1, pp. 74–85. DOI: 10.1634/stemcells.2004–0359
12. Prevosto C., Zancolli M., Canevali P., Zocchi M. R., Poggi A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*, 2007, vol. 92, no. 7, pp. 881–888.
13. Patel S. A., Meyer J. R., Greco S. J., Corcoran K. E., Bryan M., Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *Journal of Immunology*, 2010, vol. 184, no. 10, pp. 5885–5894. DOI: 10.4049/jimmunol.0903143
14. Karlsson H., Samarasinghe S., Ball L. M., Sundberg B., Lankester A. C., Dazzi F., Uzunel M., Rao K., Veys P., Le Blanc K., Ringden O., Amrolia P.J. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 3, pp. 532–541. DOI: 10.1182/blood-2007–10–119370
15. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 315–317.
16. Koren' S. V., Kabanova Ju. A., Antonevich N. G., Duzh E. V., Goncharov A. E., Gorbunov V. A., Shimanovich V.P. Collection of cultures of human and animal cells RRPC of epidemiology and microbiology: current state and prospects of development. *Sovremennye problemy infekcionnoj patologii* [Modern problems of human infectious pathology]. Minsk, 2015, iss. 8, pp. 162–168 (in Russian).
17. Hancharou A. Y., Duzh E. V., DuBuske L. M. Comparative profile of surface and intracellular molecule expression in 10 immortalized human T cell lines to be considered for immunomodulatory drug evaluations. *Allergy*, 2016, vol. 71, suppl. 102, p. 187.
18. Janeway C., Murphy K., Travers P., Walport M. *Janeway's Immunobiology*. New York, 2017, ch. 9, pp. 345–395.
19. Alter G., Malenfant J. M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, 2004, vol. 294, no. 1/2, pp. 15–22. DOI: 10.1016/j.jim.2004.08.008
20. Brunner K. T., Mael J., Cerottini J.C., Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, 1968, vol. 14, no. 2, pp. 181–196.
21. Scheibenbogen C., Romero P., Rivoltini L., Herr W., Schmittel A., Cerottini J. C., Woelfel T., Eggermont A. M., Keilholz U. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN γ -ELISpot assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *Journal of Immunological Methods*, 2000, vol. 224, no. 1/2, pp. 81–89.
22. Schmittel A., Keilholz U., Thiel E., Scheibenbogen C. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISpot assay. *Journal of Immunotherapy*, 2000, vol. 23, no. 3, pp. 289–295.
23. Derby E. G., Reddy V., Nelson E. L., Malyguine A. Correlation of human CD56⁺ cell cytotoxicity and IFN- γ production. *Cytokine*, 2001, vol. 13, no. 2, pp. 85–90. DOI: 10.1006/cyto.2000.0804
24. Rininsland F. H., Helms T., Asaad R. J., Boehm B. O., Tary-Lehmann M. Granzyme B ELISpot assay for ex vivo measurements of T cell immunity. *Journal of Immunological Methods*, 2000, vol. 240, no. 1/2, pp. 143–155.
25. Shafer-Weaver K., Rosenberg S., Strobl S., Gregory Alvord W., Baseler M., Malyguine A. Application of the granzyme B ELISPOT assay for monitoring cancer vaccine trials. *Journal of Immunotherapy*, 2006, vol. 29, no. 3, pp. 328–335. DOI: 10.1097/01.cji.0000203079.35612.c8
26. Maecker H. T. Multiparameter flow cytometry monitoring of T cell responses. *Methods in Molecular Biology*, 2009, vol. 485, no. 3, pp. 375–391. DOI: 10.1007/978–1-59745–170–3_25
27. Zaritskaya L., Shurin M. R., Sayers T. J., Malyguine A. M. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Review of Vaccines*, 2010, vol. 9, no. 6, pp. 601–616. DOI: 10.1586/erv.10.49
28. Noto A., Nquav P., Trautmann L. Cell-based flow cytometry assay to measure cytotoxic activity. *Journal of Visualized Experiments*, 2013, no. 82, p. e51105. DOI: 10.3791/51105

Информация об авторах

Антоневич Наталья Георгиевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: antonevich.n@gmail.com.

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com.

Information about the authors

Natalia H. Antonevich – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antonevich.n@gmail.com.

Andrei Y. Hancharou – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com.

Бущик Оксана Васильевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: oksanabuschik@gmail.com.

Рында Елена Геннадьевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alenarynda@gmail.com.

Чекан Валерий Леонидович – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. Сухая, 8, 220004, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lor3377@yandex.ru.

Стринкевич Эльвира Анатольевна – канд. мед. наук, ассистент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. Сухая, 8, 220004, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lorkafedra@tut.by.

Oksana V. Buschik – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oksanabuschik@gmail.com.

Alena G. Rynda – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alenarynda@gmail.com.

Valery L. Chekan – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (8, Sukhaya Str., 220004, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lor3377@yandex.ru.

Elvira A. Strinkevich – Ph. D. (Med.), Assistant. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (8, Sukhaya Str., 220004, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lorkafedra@tut.by.