БИОХИМИЯ, 2021, том 86, вып. 2, с. 248 – 258

УДК 571.27

ГУМОРАЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В-КЛЕТОЧНОЙ ОПУХОЛИ НА МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА*

© 2021 Н.А. Петинати[1], А.Е. Бигильдеев[1], Д.В. Карпенко[1], Н.В. Сац[1], Н.М. Капранов[1], Ю.О. Давыдова[1], Е.А. Фастова[1], А.У. Магомедова[1], С.К. Кравченко[1], Г.П. Арапиди[2,3,4], М.И. Русанова[5], М.А. Лагарькова[2], Н.И. Дризе[1], В.Г. Савченко[1]**

[1] *Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России, 125167 Москва, Россия; электронная почта: loel@mail.ru*

[2] *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435 Москва, Россия*

[3] *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия*

[4] *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия*

[5] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 30.07.2020
После доработки 14.09.2020
Принята к публикации 14.09.2020

У больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) без вовлечения костного мозга изменены свойства костномозговых мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК). Было предположено, что в плазме больных содержатся растворимые факторы, влияющие на свойства МСК и их активацию у пациентов. Проверка этой гипотезы стала целью данного исследования. Для анализа цитокинов и хемокинов в плазме был использован набор Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel, экспрессию генов в МСК оценивали ПЦР в реальном времени. Сравнительный анализ концентрации цитокинов в плазме больных, до и через месяц после окончания лечения, и здоровых доноров выявил достоверные отличия в концентрации 14 из 27 изученных цитокинов. В плазме больных нарушены взаимосвязи между уровнями секретируемых цитокинов, т.е. происходит нарушение регуляции иммунного ответа. Некоторые связи восстанавливаются после окончания лечения. Культивирование МСК здоровых доноров в присутствии плазмы пациентов приводит к изменениям их свойств, подобным изменениям, наблюдаемым в МСК больных. Впервые показано, что у пациентов с ДВККЛ без вовлечения костного мозга предшественники стромального микроокружения – МСК – изменяются из-за гуморального эффекта опухоли и реакции организма на нее. Комплексный анализ выявил, что при достижении ремиссии у пациентов с ДВККЛ состав цитокинов плазмы частично нормализуется, но не достигает уровня здоровых доноров. Обнаружение нового аспекта влияния В-клеточной опухоли на организм может позволить выявить общие закономерности гуморального влияния различных опухолей на стромальные клетки костного мозга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДВККЛ, МСК, цитокины и хемокины, секреция.

DOI: 10.31857/S0320972521020093

ВВЕДЕНИЕ

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – гетерогенная группа заболеваний, различающаяся по гистологическим, иммуногистохимическим и молекулярным характеристикам [1]. При ДВККЛ только у 10–25% больных с помощью гистологического или молекулярного методов исследования выявляется поражение костного мозга (КМ) [2]. Считается, что у остальных пациентов с ДВККЛ КМ не вовлечен в опухолевой процесс. Стро-

Принятые сокращения: ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома; КМ – костный мозг; КОЕф – колониеобразующая единица фибробластов; МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; ОУЭ – относительный уровень экспрессии; СУФ – средний уровень флуоресценции; IFN-γ – интерферон гамма; IL – интерлейкин; TNFα – фактор некроза опухолей.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-242, 21.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

мальные клетки-предшественницы КМ у больных ДВККЛ без вовлечения КМ изменены [3]. Такие изменения нельзя отнести к взаимодействию с опухолевыми клетками, как это происходит при лейкозах [4, 5]. Многие опухоли секретируют цитокины и хемокины [6, 7], более того, наличие опухоли в организме может быть рассмотрено как воспалительный процесс [8, 9]. Воспаление связано с релизом множества факторов, которые могут активировать клетки стромального микроокружения КМ, в частности мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), участвующие в регуляции кроветворения [10]. Активированные интерлейкином-1 (IL-1), фактором некроза опухоли альфа (TNFα) и интерфероном гамма (IFN-γ) МСК секретируют ингибиторы и активаторы воспалительного процесса [11]. Ранее было показано, что у больных ДВККЛ без поражения КМ суммарная клеточная продукция МСК, полученных из КМ за 4 пассажа, выше, чем у доноров соответствующего возраста [3]. В МСК этих больных повышена экспрессия *FGFb*, *FGFR2*, *IL-6*, *IL-8* и других генов. Нами было предположено, что в плазме больных содержатся растворимые факторы, скорее всего, это провоспалительные цитокины и хемокины, влияющие на свойства МСК и их активацию у пациентов. Проверка этой гипотезы стала целью данного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В работе исследовали МСК 35 больных с ДВККЛ без вовлечения костного мозга. Перед забором крови и КМ пациенты и доноры подписали информированное согласие. Характеристики всех пациентов, вошедших в исследование, представлены в табл. 1 в Приложении. Состав цитокинов и хемокинов изучали в плазме крови у 9 больных ДВККЛ до начала и через месяц после окончания лечения. В качестве контроля использовали плазму от 5 здоровых доноров (1 муж., 4 жен.) в возрасте 34–67 лет. У всех больных после комплексного лечения была достигнута ремиссия заболевания, подтвержденная данными ПЭТ-КТ. Данные об этих пациентах представлены в таблице.

Анализ цитокинов и хемокинов. Для анализа цитокинов и хемокинов в плазме был использован набор Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel, 27-Plex («BioRad», США) для определения концентрации IL-1β, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, FGF*b*, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1α, MIP-1β, PDGF-bb, RANTES, TNFα, VEGF согласно рекомендациям производителя. Обнаружение флуоресцентных шариков проводили на системе Bio-Plex 200 («BioRad», США). Все экс-

Характеристики пациентов с ДВККЛ (КОЕф и МСК до и через месяц после окончания лечения)

№	Возраст	Пол м/ж	Проведенное лечение	До лечения		Через месяц после окончания лечения	
				КОЕф на 10^6 клеток КМ	Продукция МСК за 3 пассажа, ($\times 10^6$)	КОЕф на 10^6 клеток КМ	Продукция МСК за 3 пассажа, ($\times 10^6$)
1	30	м	R-(DA)-EPOCH (6 циклов)	3	13,9	6,0	9,30
2	60	ж	предфаза, R-NHL BFM-90 (6 циклов) + auto HSCT	20	7,6	4,0	7,00
3	68	ж	R-CHOP-21 (6 циклов)	4	6,2	3,0	4,10
4	60	ж	R-(DA)-EPOCH (6 циклов) + + R-DHAP(2 цикла)	7	6,5	1,0	8,00
5	63	ж	R-CHOP-21 (6 циклов)	3	21,3	2,0	22,40
6	38	ж	R-(DA)-EPOCH + auto HSCT	4	16,9	12,0	7,30
7	48	ж	R-CHOP-21 (4 цикла)	3	7,1	1,0	17,00
8	61	ж	R-(DA)-EPOCH (5 циклов) + + DHAP (1 цикл)	7	4,7	58,0	4,47
9	70	ж	R-CHOP-21 (6 циклов)	2	4	58,0	16,0

Примечание. R-(DA)-EPOCH, R-NHL BFM-90, R-CHOP-21 – названия комплексных циклов химиотерапии; auto HSCT – аутотрансплантация гемопоэтических клеток.

перименты проводили в трех независимых повторах.

Определение концентрации КОЕф в костном мозге пациентов и характеристики МСК. Анализ концентрации колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) в КМ больных и МСК проводили, как описано ранее [3].

Действие плазмы пациентов на МСК здоровых доноров. Для анализа действия плазмы больных ДВККЛ на МСК из КМ здоровых доноров были использованы 10 образов МСК (4 муж. и 6 жен. в возрасте 14–50 лет, медиана возраста 33 года). МСК доноров культивировали 10 дней в бессывороточной среде StemPro («Gibco», Нидерланды) в присутствии 10% плазмы от 5 здоровых доноров и плазмы 9 больных ДБККЛ до начала и через месяц после окончания лечения. Каждый образец плазмы добавляли в отдельную ячейку с МСК. В МСК доноров, обработанных плазмой больных, исследовали суммарную клеточную продукцию, анализировали экспрессию поверхностных маркеров (средний уровень флуоресценции (СУФ) и относительный уровень экспрессии (ОУЭ)) некоторых генов.

Анализ поверхностных антигенов МСК. Определение уровня экспрессии антигенов на МСК производили методом проточной цитометрии. После снятия МСК со дна флакона их дважды отмывали раствором CellWash («BD Biosciences», США) и после этого 2×10^4 клеток инкубировали 20 мин в темноте с моноклональными антителами: анти-HLA-ABC, мечеными флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) («Biolegend», США); анти-CD90, мечеными фикоэритрином (PE) («BD Pharmingen», США); анти-CD73, мечеными PE («BD Pharmingen», США); анти-CD105, меченными FITC («Biolegend», США); анти-CD-54, мечеными аллофикоцианином (APC) («Biolegend», США); анти-CD146, мечеными PE («BD Pharmingen», США). Анализ проводили с использованием проточного цитометра FACSCanto II («BD Biosciences», США), данные анализировали с помощью программы FACSDiva («BD Biosciences», США).

Популяцию МСК определяли сначала по параметрам прямого и бокового светорассеяния, а также по экспрессии на поверхности клеток антигена CD90. В данной популяции клеток оценивали средний уровень флуоресценции (MFI/СУФ) по каналам, соответствующим APC, FITC и PE.

Анализ экспрессии генов в МСК. Определение уровня экспрессии генов проводили методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (модификация Taq-Man) на приборе Abiprism 7500 («Applied Biosystems», США). Для выделения РНК был использован TRIzol («Life Technologies», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для построения первых цепей ДНК после гибридизации мРНК со смесью (поли-Т)-праймеров и случайных гексамеров использовали обратную транскриптазу M-MLV («Promega», Франция) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормализации образцов использовали гены «домашнего хозяйства» *BACT* (бета-актин) и *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа), относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом ΔΔCt [12]. Ген-специфические праймеры и зонды были разработаны авторами и синтезированы («Syntol R & D», Россия) (табл. 2 в Приложении).

Статистическая обработка результатов. Графическая обработка результатов выполнена с использованием программы GraphPad Prism 8 (www.graphpad.com). Когда была подтверждена нормальность распределения, сравнение образцов проводилось с использованием критерия Стьюдента, в противном случае использовались тесты Манна–Уитни – для непарных образцов или критерий Вилкоксона – для парных образцов, различия при $p < 0,05$ считались значимыми. Взаимосвязи между изменениями концентрации различных цитокинов в плазме пациентов определяли по критерию корреляции Пирсона. Коэффициент корреляции анализировали с использованием программы GraphPad Prism 8, $R > 0,7$ или $R < -0,7$ при $p < 0,05$ считали значимой сильной корреляцией.

Был проведен комплексный анализ различий между цитокинами в 3-х изученных группах. Анализ основан на определении расстояний между точками в многомерном пространстве исследуемых параметров. Колебания и значимость различий для каждого изменения были рассчитаны индивидуально. Расчеты по комплексному анализу различий между образцами представлены в Приложении.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Концентрация цитокинов в плазме больных ДВККЛ. Сравнительный анализ концентрации цитокинов в плазме больных (до и через месяц после окончания лечения) и здоровых доноров выявил достоверные отличия в концентрациях 14 из 27 изученных цитокинов (рис. 1; табл. 3 в Приложении). Концентрация некоторых цитокинов была достоверно повышена в плазме первичных больных по сравнению с плазмой доноров. Так, концентрация в плазме IL-2 была в 1,5 раза выше, чем у доноров, IL-6 – в 8,5 раза,

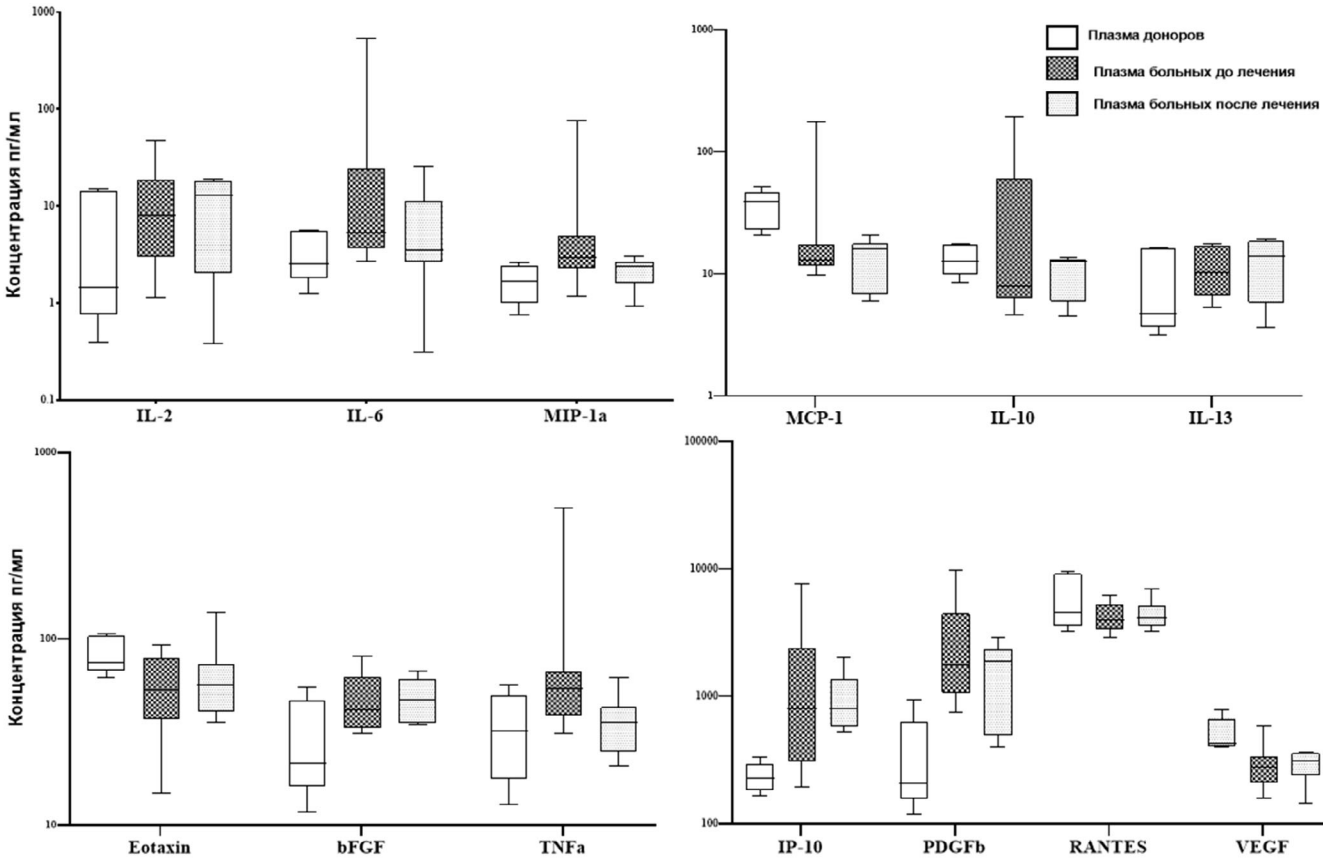

Рис. 1. Достоверные различия в уровне цитокинов и факторов роста в плазме доноров и пациентов с ДВККЛ до и после лечения. На прямоугольниках горизонтальная линия представляет медиану, длина прямоугольника представляет межквартильный диапазон, а вертикальные линии простираются до минимальных и максимальных значений. На рисунке показаны только цитокины, концентрация которых в плазме доноров и пациентов значительно отличается ($p < 0,05$). Плазма у 9 пациентов была исследована до и через месяц после окончания лечения. В качестве контроля использовали плазму от 5 здоровых доноров (1 муж. и 4 жен.) в возрасте 34–67 лет

IL-10 – в 5 раз, Eotaxin – в 1,5 раза, FGF*b* – в 1,5 раза, IP-10 – в 2,5 раза, MIP-1α – в 10 раз, MIP-1β – в 3 раза, PDGF-bb – в 3,5 раза, RANTES – в 2 раза, TNFα – в 4 раза и VEGF – в 1,2 раза выше, чем у доноров. После окончания лечения концентрация большинства провоспалительных цитокинов и хемокинов, повышенная по сравнению с донорами в плазме больных ДВККЛ в дебюте заболевания, нормализуется (IL-Ra, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, TNFα) (см. табл. 3 в Приложении). Хемокины и цитокины, связанные с параметрами роста МСК, а также участвующие в процессах иммуномодуляции, изменяются значительно медленнее и не нормализуются через месяц после окончания терапии (IL-2, Eotaxin, FGF*b*, IP-10, MCP-1, PDGF-bb, RANTES, VEGF).

Относительный уровень экспрессии генов в МСК пациентов с ДВККЛ. Поскольку было показано, что МСК пациентов с ДВККЛ изменены, мы изучили относительный уровень экспрессии генов, которые могли способствовать изменениям цитокинов в плазме крови пациентов. Сравнивали экспрессию генов в МСК из костного мозга первичных пациентов, пациентов после лечения и здоровых доноров. Уровень экспрессии *IL-6*, *FGFb* и *FGFR2* был повышен в МСК первичных пациентов по сравнению с МСК доноров (рис. 2). Принимая во внимание, что относительный уровень экспрессии *VEGF* и генов рецепторов *FGFR1* и *PDGFRb* были выше в МСК доноров, чем в МСК пациентов, а после окончания лечения восстановился только уровень экспрессии *VEGF*, можно говорить о различном влиянии химиотерапевтических препаратов на экспрессию генов, регулирующих поддержание и дифференцировку МСК.

Корреляционные связи между цитокинами в плазме больных ДВККЛ. Анализировали корреляцию между цитокинами в плазме больных и здоровых доноров. Изменение корреляции свидетельствует о нарушении взаимосвязи между

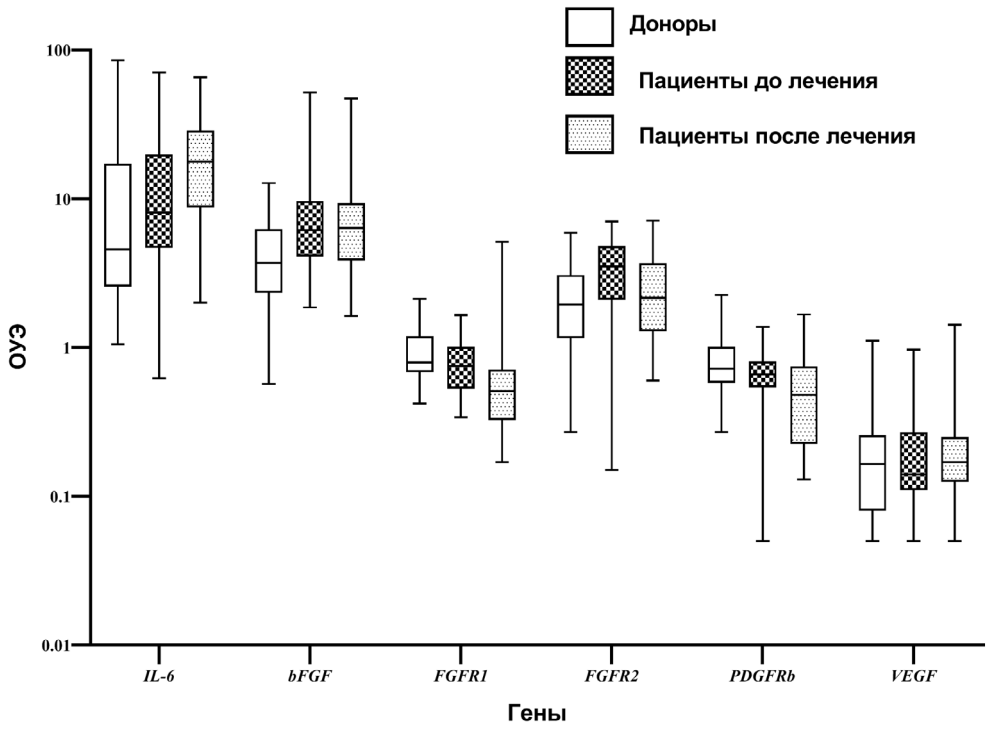

Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов в МСК здоровых доноров и пациентов с ДВККЛ до и после лечения. На графиках в прямоугольниках горизонтальная линия представляет медиану, длина рамки представляет интервал между четвертями, а вертикальные линии доходят до минимальных и максимальных значений. Были проанализированы МСК от 30 здоровых доноров и 29 пациентов с ДВККЛ

этими цитокинами, иными словами, об изменении регуляции иммунного ответа. В анализ были включены только достоверные тесные взаимосвязи ($R > 0,7$ и $R < -0,7$, $p < 0,05$). Корреляции между концентрациями цитокинов в плазме здоровых доноров отличаются от таковых в плазме больных как до, так и после окончания лечения (табл. 4 в Приложении).

В плазме доноров тесно связаны концентрации: **IL-6** с IL-9, IL-10, IL-13 и FGF*b*; **IL-9** с IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, GM-CSF и VEGF; **IL-12** с IL-1b и IL-10; **IL-7** с IL-4; **MIP-1α** с IL-5 и GM-CSF; **GM-CSF** с Eotaxin; **TNFα** с PDGF-bb. Перечисленные комбинации цитокинов не имеют взаимосвязи в плазме больных до и после лечения.

Корреляции присутствуют у всех доноров и больных: **IL-1Ra** с IL-1b; **IL-2** с IL-5, IL-6, IFN-γ и FGF*b*; **IL-4** с IL-1Ra; **IL-5** с IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, GM-CSF и FGF*b*; **IL-6** с IFN-γ; **IL-8** с IFN-γ и MIP-1α; **IL-12** с IL-13 и FGF*b*; **IL-13** с FGF*b*; **IL-17** с FGF*b*; **TNFα** с MIP-1β.

Корреляции у доноров и больных до лечения обнаруживались между: **IL-1Ra** с IFN-γ; **IL-4** с IL-1b, IL-2, FGF*b* и IFN-γ; **IL-6** с MIP-1α; **IL-10** с IL-15 и FGF*b*; **TNFα** с MCP-1 и с RANTES; **RANTES** с MIP-1β – и все они отсутствовали после лечения.

Корреляции только у больных до лечения, которые не обнаруживались ни у доноров, ни у больных после лечения: **IL-2** с IL-1Ra; **IL-8** с IL-6; **IL-15** с IL-7; **IL-17** с IL-4; **G-CSF** с IL-17, IL-2, IL-6, IL-8 и IFN-γ; **MCP-1** с G-CSF, IL-6, IL-1Ra, G-CSF, IFN-γ, IL-17, IL-2 и MIP-1α; **PDGF-bb** с Eotaxin; **RANTES** с Eotaxin, IL-13, MIP-1α и PDGF-bb; **TNFα** с IFN-γ, IL-17, IL-2, IL-6 и IL-1b; **VEGF** с G-CSF, IL-17, IL-1b, IL-1Ra, IL-4, MIP-1α, MIP-1β, TNFα.

Корреляции у больных до и после лечения, которых нет у доноров: **MCP-1** с IL-1b, IL-1Ra, IL-2; **G-CSF** с IL-1Ra и IL-4; **GM-CSF** с IL-2; **IL-15** с IL-13; **IL-17** с IL-1Ra; **IL-17** с IL-2, **IL-8** с IL-2; **MIP-1α** с G-CSF, IL-1b и IL-4; **MIP-1β** с IL-1Ra; **TNFα** с IL-1Ra, IL-4 и MIP-1α; **VEGF** с FGF*b*, IL-2, IL-5, IL-6 и IL-8.

Корреляции у доноров и больных после лечения: **IL-2** с IL-7, IL-10, IL-12 и IL-13; **IL-5** с IFN-γ; **IL-6** с IL-12 и GM-CSF; **IL-7** с IL-10, IL-17 и IFN-γ; **IL-8** с FGF*b*; **IL-10** с IL-13 и IL-17; **IL-12** с IFN-γ; **IL-13** с VEGF; **IFN-γ** с FGF*b*.

Помимо анализа корреляций цитокинов и хемокинов между собой в плазме больных ДВККЛ был проведен анализ корреляций между экспрессией генов в МСК 5 больных и концентрацией цитокинов в плазме этих пациентов (таблица, пациенты №№ 3–7; табл. 5 в При-

ложении). Оказалось, что концентрация IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5 (p = 0,041 с *BMP2*), IL-10, IL-15 (p = 0,02 с *BMP2*), VEGF (p = 0,021 с *BMP2*) и FGF*b* (p = 0,024 с *BMP2*) тесно положительно коррелируют с экспрессией *BMP2* и *SOX9*. Кроме того, с *BMP2* тесно коррелируют IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, GM-CSF и MCP-1 (p = 0,024). IL-4 и IL-7 тесно коррелируют с *FGFR1, FGFR2, VEGF*.

Обратная корреляция выявлена между концентрацией IL-6 в плазме пациентов и экспрессией генов *MMP2*, *SPP1*, *ICAM1* и *SMURF*. Eotaxin имеет обратную сильную взаимосвязь с экспрессией *IL-6*, *SOX9* (p = 0,015). G-CSF имеет обратную сильную корреляцию с экспрессией *ICAM1* (p = 0,033) и *SMURF*. *SMURF*, в свою очередь, обратно коррелирует с концентрацией в плазме IP-10, MIP-1α и RANTES. MIP-1β обратно коррелирует с *FGFb* (p = 0,025) и *IL-8* (p = 0,02). Концентрация RANTES в плазме обратно коррелирует с экспрессией *FGFR2* (R = –0,958, p = 0,01) (табл. 5 в Приложении). Других тесных взаимосвязей между концентрацией цитокинов и хемокинов в плазме и экспрессией генов выявлено не было.

Концентрация КОЕф в костном мозге больных ДВККЛ до начала лечения тесно коррелирует с концентрацией в плазме следующих цитокинов: IL-1Ra (R = 0,717, p > 0,05), IL-6 (R = 0,956, p = 0,022), IL-8 (R = 0,717, p > 0,05), G-CSF (R = 0,717 p > 0,05), MIP-1α (R = 0,717, p > 0,05), VEGF (R = 0,717, p > 0,05), однако достоверная корреляция КОЕф выявлена только с IL-6. После окончания лечения какие-либо положительные корреляции концентрации цитокинов в плазме и КОЕф отсутствуют.

На основании этих изменений в плазме больных ДВККЛ было предположено, что плазма больных будет действовать на МСК здоровых доноров.

Действие плазмы больных ДВККЛ на МСК здоровых доноров. Культивирование МСК доноров в присутствии плазмы доноров и больных ДВККЛ (до и через месяц после окончания лечения) выявило достоверные изменения в суммарной клеточной продукции МСК за 2 исследованных пассажа (3 и 4 пассажи). Оказалось, что культивирование МСК доноров в присутствии плазмы больных до лечения снижает клеточную продукцию, а плазма больных после окончания лечения повышает ее (рис. 3, *а*).

Количество клеток в культурах МСК, обработанных плазмой доноров, прямо коррелирует с концентрацией GM-CSF в плазме доноров (R = 0,708, p = 0,018). Не обнаруживается корреляций между количеством клеток в культурах МСК доноров, обработанных плазмой больных до начала лечения, и цитокинами в плазме этих больных ДВККЛ. Количество клеток в культурах МСК доноров, культивированных в присутствии плазмы больных после окончания лечения, имеет только обратную, но не достоверную корреляцию с IL-2 (R = –0,729), IP-10 (R = –0,742), MCP-1 (R = –0,801) и RANTES (R = –0,814).

Анализ поверхностных маркеров МСК доноров после культивирования в присутствии плазмы здоровых доноров и больных ДВККЛ показал, что процент МСК, экспрессирующих на поверхности CD54 (ICAM1), повышается почти в 2 раза при культивировании в присутствии плазмы больных по сравнению с клетками, культивированными с плазмой доноров (p = 0,0032) (рис. 3, *б*). Одновременно увеличивается и ОУЭ CD54 на МСК, обработанных плазмой больных (рис. 3, *в*). ОУЭ гена *ICAM1* повышается в МСК, обработанных плазмой больных в дебюте заболевания, и остается повышенным после лечения. ICAM1 – молекула адгезии, обеспечивающая взаимодействие МСК с лимфоцитами, и ее повышение указывает на активацию МСК, обработанных плазмой больных. СУФ CD105 (ENG) и CD146 (MCAM) снижены в МСК, которые культивировали с плазмой больных. СУФ CD274 (PD-L1) повышается на МСК при добавлении плазмы больных в дебюте и еще больше возрастает при добавлении плазмы больных после лечения.

При анализе относительного уровня экспрессии генов выяснилось, что в МСК, обработанных плазмой больных, снижается экспрессия *IL-1b*, *IL-8*, *SDF1* и *LIF* (рис. 3, *в*). Экспрессия *SDF1* после лечения повышается до уровня, соответствующего МСК, обработанных плазмой доноров.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитокины и хемокины секретируются в кровь различными тканями. В норме все факторы, регулирующие кроветворение, секретируются различными органами, например GM-CSF и G-CSF секретируются легкими, мышцами, эндотелием мочевого пузыря, лимфоцитами [13]. IL-6 продуцируется гладкомышечными клетками, эндотелием сосудов, макрофагами [14]. Хемокины также продуцируются большим количеством тканей и опухолевыми клетками [6]. Стромальные клетки костного мозга, в том числе МСК, участвуют в секреции цитокинов и хемокинов, регулирующих кроветворение и иммунный ответ [11]. Концентрация цитокинов в крови очень невелика, но может возрас-

тать во много раз в зависимости от запроса организма. Баланс цитокинов и их взаимосвязи могут изменяться при патологии. Исследование плазмы больных ДВККЛ показало достоверное увеличение концентрации по крайней мере 14 цитокинов из 27 изученных по сравнению с донорами. Концентрация некоторых из них нормализуется после достижения ремиссии и окончания лечения. Однако другие цитокины, такие как FGF*b*, Eotaxin, VEGF и RANTES, остаются повышенными. Мы также наблюдали аналогичные изменения в экспрессии FGF*b* в МСК пациентов, что указывает на вклад МСК в повышение концентрации этого фактора в плазме пациентов.

Комплексный анализ различий между всеми изученными цитокинами, хемокинами и корреляциями между ними выявил четкое разделение здоровых доноров и пациентов до и после лечения (рис. 4).

Выявленные изменения могут быть связаны с секрецией опухолевыми клетками или реакцией тканей организма, включая МСК, на наличие опухоли или терапии. Комплексный анализ показывает, что при достижении ремиссии у пациентов с ДВККЛ состав цитокинов плазмы нормализуется, но не достигает уровня здоровых доноров. Не только баланс цитокинов в плазме крови, но и изменения в строме костного мозга остаются частично нарушенными, вероятно, в какой-то степени из-за курсов химиотерапии.

Взаимосвязь между цитокинами имеет большое значение для регуляции кроветворения и воспаления. В плазме здоровых доноров выявлены нормальные для организма корреляции, обеспечивающие созревание кроветворных клеток [15]. Некоторые из этих взаимосвязей сохраняются и у больных ДВККЛ – это корреляции факторов, участвующих в созревании мегакарио-

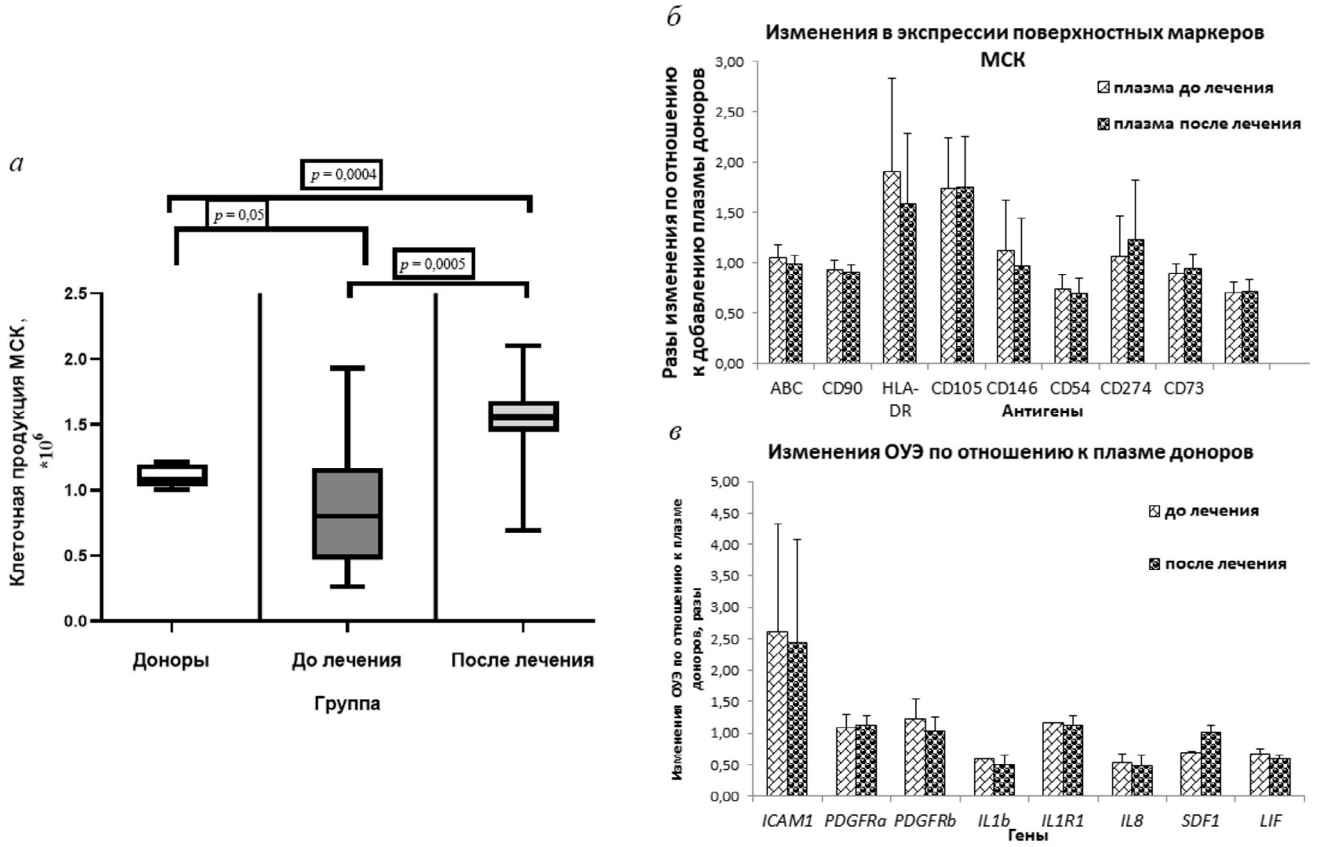

Рис. 3. Влияние плазмы пациентов ДВККЛ на МСК здоровых доноров. *а* – Тотальная клеточная продукция МСК здоровых доноров в присутствии плазмы здоровых доноров и пациентов до и после лечения. На графиках в прямоугольниках горизонтальная линия представляет медиану, длина рамки представляет интервал между четвертями, а вертикальные линии доходят до минимальных и максимальных значений. *б* – Изменения в экспрессии поверхностных маркеров на донорских МСК, культивируемых в присутствии плазмы пациентов, по сравнению с культивированием с плазмой доноров. *в* – Изменения в экспрессии генов в МСК доноров, культивированных в присутствии плазмы пациентов, по сравнению с культивированием в плазме доноров. Были проанализированы МСК от 10 здоровых доноров, культивируемых в присутствии плазмы доноров (5 образцов) и плазмы пациентов с ДВККЛ до (21 образец) и после (18 образцов) лечения

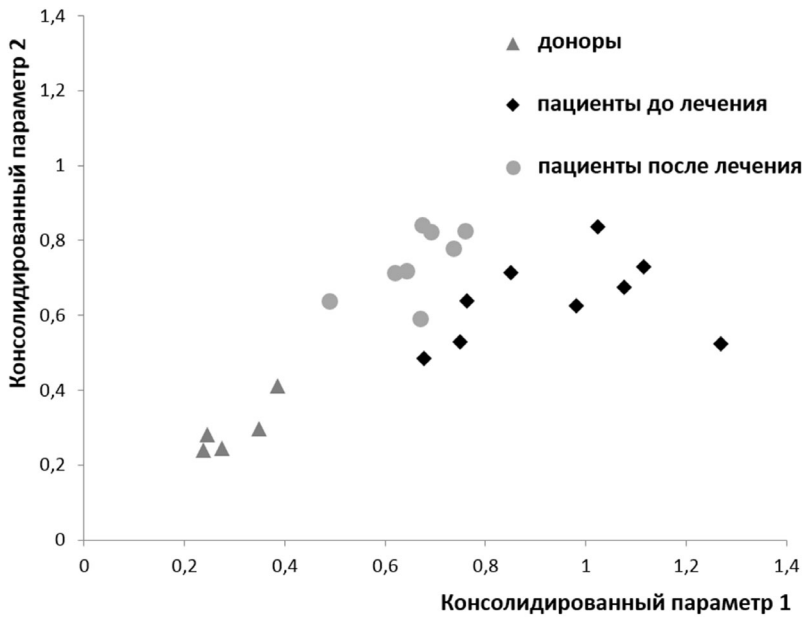

Рис. 4. Комплексный анализ хемокинов и цитокинов здоровых доноров и больных ДВККЛ. Все данные по хемокинам и цитокинам проецируют здоровых доноров и пациентов с ДВККЛ до и после лечения на ось консолидированных параметров. Точка на диаграмме показывает, во сколько раз образец ближе к группе доноров, чем к группе пациентов до лечения (ось абсцисс) или после лечения (ось ординат). Расчет расстояния в многомерном пространстве между образцом и группой представлен в Приложении

цитов, дендритных клеток, некоторых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов.

В дебюте заболевания возникают изменения, которые, вероятнее всего, связаны с присутствием опухоли в организме. Наблюдается повышение факторов воспаления, увеличивающих продукцию и созревание нейтрофилов и макрофагов, таких как IL-6, IL-17, G-CSF, MCP-1 и MIP-1α. Уровень большинства из этих факторов в дебюте заболевания коррелирует между собой.

Регуляция врожденного иммунитета эффекторными и регуляторными В-клетками связана с экспрессией IL-12 и IFN-γ (эффекторные клетки) и IL-10 (регуляторные клетки) [10]. В плазме больных нет корреляции между IL-12, IFN-γ и IL-10 в дебюте заболевания. После окончания лечения между этими цитокинами возникает связь высокой тесноты, что говорит о том, что у больных в дебюте заболевания нарушен механизм врожденного иммунитета, который восстанавливается после окончания лечения.

В регуляции адаптивного иммунитета принимают участие IL-4, IL-2 и IL-13, секретируемые эффекторными В-клетками, и IL-10, секретируемый регуляторными В-клетками. У пациентов до лечения коррелирует секреция IL-2 и IL-4, остальные не связаны. Однако после окончания лечения возникает корреляция между IL-2, IL-12 и IL-10, что указывает на восстановление функций В-клеток, участвующих в адаптивном иммунном ответе. Уровень IL-10 повышен в плазме больных до лечения (рис. 1). Подобное повышение выявлено в мышиных моделях красной волчанки [16]. После окончания лечения уровень IL-10 нормализуется. Известно, что цитокиновый профиль, секретируемый В-клетками, может быть изменен при различных заболеваниях, в некоторых случаях он нормализуется при лечении больных ритуксимабом [17].

Происходящие у больных ДВККЛ без поражения костного мозга изменения затрагивают не только кроветворные клетки и цитокины, но и другие ткани, в том числе стромальное микроокружение костного мозга. У больных в плазме крови до начала лечения значительно повышены уровни IL-6 и MIP-1α, которые после окончания лечения снижаются до нормальных значений. Эти цитокины участвуют в остром воспалительном процессе (acute inflammatory state). Их концентрация в плазме коррелирует с концентрацией КОЕф в костном мозге, что указывает на ответ стромальных предшественников на воспалительный процесс в организме. При достижении ремиссии корреляции исчезают, вероятнее всего, за счет того, что вне опухолевого и воспалительного процессов концентрация КОЕф регулируется другими факторами. IL-10 секретируется клетками ДВККЛ [18]. Концентрация IL-8, MIP-1α и IL-10 повышена в различных жидкостях, связанных с опухолью, и в пери-

туморальной области (peritumoral tissue) [6]. Показано, что концентрация L-8, IP-10, MCP-1, MIP-1β, IL-6, IL-12p40/p70, MIP-1α, IFN-α, G-CSF и IL-2R снижается после удаления опухолей головного мозга в перитуморальной области [19]. То есть показанные в нашей работе повышение и корреляция этих факторов в плазме больных ДВККЛ указывают на то, что опухоль может вносить значительный вклад в секрецию этих цитокинов и хемокинов.

Свойства МСК больных ДВККЛ изменены – суммарная клеточная продукция, иммунофенотип и экспрессия многих генов [3]. В настоящей работе были проанализированы связи между концентрацией цитокинов в плазме больных и экспрессией некоторых генов в МСК этих больных в дебюте заболевания. Обнаружены прямые корреляции между экспрессией генов, связанных с пролиферацией, дифференцировкой и образованием сосудов, в МСК с провоспалительными цитокинами и GM-CSF, повышенными в плазме этих больных. Это объясняет изменения свойств МСК из костного мозга этих пациентов. Выявлено ингибирующее действие повышения IL-6, G-CSF, RANTES, MIP-1α и MIP-1β в плазме больных на гены, участвующие в дифференцировке МСК и адгезии лимфоцитов к стромальным клеткам. Так как МСК – один из главных компонентов ниши для стволовых кроветворных клеток – активно изучается изменение их характеристик при заболеваниях с вовлечением костного мозга [20]. Однако даже без прямого контакта опухолевых клеток с костным мозгом в МСК происходят значительные изменения. Более того, можно считать, что существует петля обратной связи между концентрацией цитокинов в плазме и секрецией цитокинов МСК [21]. Ранее показано, что в секретоме МСК больных ДВККЛ без вовлечения костного мозга, по сравнению с секретомом МСК здоровых доноров, повышена концентрация белков IL-6, IL-8, MCP-1, TNFα, ICAM1 и M-CSF [22]. Таким образом, МСК из костного мозга больных ДВККЛ также вносят свой вклад в изменение концентрации и баланса цитокинов в плазме больных в дебюте заболевания.

Исходя из полученных нами результатов, решено было изучить влияние плазмы больных ДВККЛ на МСК здоровых доноров. Показано, что добавление плазмы больных в дебюте заболевания достоверно снижает суммарную клеточную продукцию МСК здоровых доноров, тогда как добавление плазмы больных после окончания лечения повышает ее в 2 раза (рис. 3, *а*). Кроме суммарной клеточной продукции, изменяются также и поверхностные маркеры МСК. При добавлении плазмы больных в дебюте заболевания повышается способность МСК к адгезии лимфоцитов за счет повышения экспрессии ICAM1 как на уровне РНК (рис. 3, *в*), так и на уровне белка. При этом в плазме больных до и после окончания лечения есть факторы, которые повышают способность МСК ингибировать активацию лимфоцитов (PD-L1). Одновременно у этих МСК уменьшается способность регулировать стволовые кроветворные клетки и клетки эндотелия за счет снижения ENG и MCAM (рис. 3, *б*). Повышение экспрессии HLA-DR на МСК здоровых доноров при добавлении в среду культивирования плазмы больных может быть связано с активацией этих клеток.

Все цитокины, экспрессия которых снижается в МСК, культивированных с плазмой больных, участвуют в регуляции кроветворных клеток и иммунном ответе. Экспрессия SDF1, в отличие от остальных цитокинов, повышается до уровня, соответствующего МСК, обработанных плазмой доноров после лечения (рис. 3, *в*). Эти данные указывают на то, что нормализуется способность МСК регулировать миграцию кроветворных клеток в костном мозге, а также на то, что происходящие при ДВККЛ изменения в МСК могут быть обратимы.

Таким образом, в плазме крови пациентов с ДВККЛ изменена концентрация провоспалительных и регулирующих кроветворение цитокинов. Баланс между этими цитокинами нарушен в дебюте заболевания и частично восстанавливается после окончания лечения. Очевидно, что наличие В-клеточной опухоли в организме влияет на все ткани, включая строму костного мозга. Показано, что это влияние осуществляется, как минимум, частично через растворимые факторы. МСК, не контактирующие напрямую с опухолью, изменяют не только свои свойства, но и экспрессируемые и секретируемые ими факторы, внося свой вклад в изменение цитокинового профиля крови. Культивирование МСК здоровых доноров в присутствии плазмы больных ДВККЛ приводит к изменениям, подобным наблюдаемым в МСК больных. Совокупность полученных данных свидетельствует о влиянии опухолевого процесса на стромальное микроокружение костного мозга у больных ДВККЛ независимо от межклеточного контакта МСК с опухолевыми клетками. Результаты работы демонстрируют гуморальную регуляцию стромы костного мозга опухолевыми клетками напрямую или опосредованно.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фунда-

ментальных исследований (грант № 17-04-00170).

Благодарности. Авторы благодарят О. Пшеничникову за продуктивное обсуждение материалов работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований, не одобренных этическим комитетом ФГБУ НМИЦ Гематологии Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 2, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beltran, B. E., Quiñones, P., Morales, D., Malaga, J. M., Chavez, J. C., et al. (2018) Response and survival benefit with chemoimmunotherapy in Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma, *Hematol. Oncol.*, **36**, 93-97, doi: 10.1002/hon.2449.
2. Swerdlow, S. H., World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (2017) in *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., and Thiele, J., eds) Vol. 2, Revised 4th Edn., International Agency for Research on Cancer, Lyon.
3. Fastova, E. A., Magomedova, A. U., Petinati, N. A., Sats, N. V., Kapranov, N. M., Davydova, Yu. O., Drize, N. I., Kravchenko, S. K., and Savchenko, V. G. (2019) Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in patients with diffuse large B-cell lymphoma, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 150-153, doi: 10.1007/s10517-019-04480-6.
4. Chen, Q., Yuan, Y., and Chen, T. (2014) Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients, *Mol. Med. Rep.*, **9**, 293-298, doi: 10.3892/mmr.2013.1789.
5. Shipounova, I. N., Petrova, T. V, Svinareva, D. A., Momotuk, K. S., Mikhailova, E. A., and Drize, N. I. (2009) Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia, *Clin. Transl. Sci.*, **2**, 67-74, doi: 10.1111/j.1752-8062.2008.00074.x.
6. Kotyza, J. (2017) Chemokines in tumor proximal fluids, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech Repub.*, **161**, 41-49, doi: 10.5507/bp.2016.062.
7. Vilgelm, A. E., and Richmond, A. (2019) Chemokines modulate immune surveillance in tumorigenesis, metastasis, and response to immunotherapy, *Front. Immunol.*, **10**, 333, doi: 10.3389/fimmu.2019.00333.
8. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation, *Nature*, **454**, 436-444, doi: 10.1038/nature07205.
9. Okrój, M., Potempa, J. (2019) Complement activation as a helping hand for inflammophilic pathogens and cancer, *Front. Immunol.*, **9**, 3125, doi: 10.3389/fimmu.2018.03125.
10. Lund, F. E. (2008) Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity, *Curr. Opin. Immunol.*, **20**, 332-338, doi: 10.1016/j.coi.2008.03.003.
11. Munir, H., Ward, L. S. C., and McGettrick, H. M. (2018) Mesenchymal stem cells as endogenous regulators of inflammation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1060**, 73-98, doi: 10.1007/978-3-319-78127-3_5.
12. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
13. Metcalf, D. (2008) Hematopoietic cytokines, *Blood*, **111**, 485-491, doi: 10.1182/blood-2007-03-079681.
14. Metcalf, D., Willson, T. A., Hilton, D. J., Di Rago, L., and Mifsud, S. (1995) Production of hematopoietic regulatory factors in cultures of adult and fetal mouse organs: measurement by specific bioassays, *Leukemia*, **9**, 1556-1564.
15. Lyman, G. H., and Dale, D. C. (2010) *Introduction to the Hematopoietic Growth Factors*, Springer, Boston, MA, pp. 3-10.
16. Lenert, P., Brummel, R., Field, E. H., and Ashman, R. F. (2005) TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production, *J. Clin. Immunol.*, **25**, 29-40, doi: 10.1007/s10875-005-0355-6.
17. Ma, N., Zhang, Y., Liu, Q., Wang, Z., Liu, X., et al. (2017) B cell activating factor (BAFF) selects IL-10-B cells over IL-10+B cells during inflammatory responses, *Mol. Immunol.*, **85**, 18-26, doi: 10.1016/j.molimm.2017.02.002.
18. Li, L., Zhang, J., Chen, J., Xu-Monette, Z. Y., Miao, Y., et al. (2018) B-cell receptor-mediated NFATc1 activation induces IL-10/STAT3/PD-L1 signaling in diffuse large B-cell lymphoma, *Blood*, **132**, 1805-1817, doi: 10.1182/blood-2018-03-841015.
19. Portnow, J., Badie, B., Liu, X., Frankel, P., Mi, S., Chen, M., and Synold, T. W. (2014) A pilot microdialysis study in brain tumor patients to assess changes in intracerebral cytokine levels after craniotomy and in response to treatment with a targeted anti-cancer agent, *J. Neurooncol.*, **118**, 169-177, doi: 10.1007/s11060-014-1415-4.
20. Cheng, H., Sun, G., and Cheng, T. (2018) Hematopoiesis and microenvironment in hematological malignancies, *Cell Regen.*, **7**, 22-26, doi: 10.1016/j.cr.2018.08.002.
21. Zhong, W., Zhu, Z., Xu, X., Zhang, H., Xiong, H., et al. (2019) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote the growth and drug-resistance of diffuse large B-cell lymphoma by secreting IL-6 and elevating IL-17A levels, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **38**, 73, doi: 10.1186/s13046-019-1081-7.
22. Petinati, N. A., Sats, N., Drize, N. J., Malyants, I., Shender, V., Grigorieva, T., Arapidi, G., Lagarkova, M., Fastova, E. A., Magomedova, A., Kravchenko, S., and Savchenko, V. (2019) Alterations in secretome and transcriptome of bone marrow derived MSCs in patients with diffuse large B-cell lymphoma without bone marrow involvement, *Blood*, **134**, 1514-1514, doi: 10.1182/blood-2019-122431.

HUMORAL EFFECT OF A B-CELL TUMOR ON THE BONE MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS*

N. A. Petinati[1], A. E. Bigildeev[1], D. S. Karpenko[1], N. V. Sats[1], N. M. Kapranov[1], Y. O. Davydova[1], E. A. Fastova[1], A. U. Magomedova[1], S. K. Kravchenko[1], G. P. Arapidi[2,3,4], M. I. Rusanova[5], M. M. Lagarkova[2], N. I. Drize[1], and V. G. Savchenko[1]**

[1] *National Research Center for Hematology, Ministry of Health, 125167 Moscow, Russia; E-mail: loel@mail.ru*

[2] *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia*

[3] *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

[4] *Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

[5] *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

The properties of bone marrow (BM)-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are altered in the patients with the diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) without BM involvement. It was suggested that plasma from the patients contains soluble factors that affect MSCs. Plasma and BM-derived MSCs from the DLBCL patients at the onset of the disease and one month after the end of treatment were studied. Concentration of the plasma cytokines and gene expression in the MSCs were evaluated by the Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel kit to measure 27 analytes and real-time PCR. Plasma and MSCs from the healthy donors were used as controls. Analysis of cytokines in the plasma from healthy donors and patients before and one month after the end of treatment revealed significant differences in the concentration of 14 out of 27 cytokines. Correlations between the levels of secreted cytokines were altered in the plasma from patients indicating that the immune response regulation was disturbed. Cultivation of the MSCs from the healthy donors in the medium supplemented with the plasma from patients led to the changes in the MSC properties, similar to those observed in the MSCs from patients. The BM-derived MSCs were shown to participate in the humoral changes occurring in the DLBCL patients. For the first time, it was shown that the precursors of the stromal microenvironment – multipotent mesenchymal stromal cells – are altered in the patients with DLBCL without bone marrow involvement due to the humoral effect of the tumor and the response of organism to it. Comprehensive analysis of the results shows that, when remission is achieved in the patients with DLBCL, composition of the plasma cytokines normalizes, but does not reach the level observed in the healthy donors. The discovery of a new aspect of the effect of the tumor B-cells on the organism could help to reveal general regularities of the humoral effect of various tumors on the bone marrow stromal cells.

Keywords: DLBCL, MSCs, cytokines, chemokines, secretion