

моделях для аллогенного использования в связи с их иммуносупрессивными свойствами. Из-за удобства сбора и выделения СК МК будет большим потенциальным источником мультипотентных клеток, так как они обладают вышеуказанными свойствами.

В настоящее время мы оцениваем возможность использования СК МК человека *in vivo* для нейродегенеративной и сердечно-сосудистой регенеративной терапии на животных моделях. Мы также находимся в процессе определения гетеро-

генной смеси типов клеток найденных в менструальной крови и оцениваем лучшее средство, чтобы выделить и культивировать чистые популяции СК МК.

Кроме того, мы также выполняем дальнейшие исследования, беря образцы от разных доноров, для определения воспроизводимости и эффективности мультипотентного дифференцированного потенциала этих клеток. Таким образом, наше исследование показывает, что уникальная и ранее не существовавшая популяция стро-

мальных СК может быть собрана, выделена, характеризована, воспроизведена и отличима от менструальной крови человека.

Литература

1. Amit N. Patel, Eulsoon Park, Michael Kuzman, Federico Benetti, Francisco J. Silva, and Julie G. Allickson. Multipotent Menstrual Blood Stromal Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation // Cell Transplantation. – Vol. 17., 2008. – P.303–311.

Татарина О.С.¹, Осипова Е.Ю.², Румянцев С.А.²

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток в клинической практике

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

² ФГУ ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва

Метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), как аутологичных, так и аллогенных, в последние годы используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников и для профилактики и терапии реакции трансплантат-против-хозяина (РТПХ). Эффективность при РТПХ связана с тем, что МСК обладают иммуносупрессивными свойствами, способны оказывать антипролиферативные эффекты на лимфоциты, ингибировать активацию и ответ Т-клеток и клеток памяти. Кроме того, МСК понижают секрецию IFN γ и усиливают (либо не изменяют) секрецию IL-4, что может способствовать преклоению иммунного ответа с преимущественно опосредованного Th1 (с выделением провоспалительных цитокинов) на опосредованный Th2 (с выделением противовоспалительных цитокинов), что является предпочтительным при терапии РТПХ.

Помимо этого, было показано, что МСК продуцируют цитокины и ростовые факторы, необходимые для пролиферации и дифференцировки кроветворных предшественников. Показана клиническая эффективность применения культивированных *ex vivo* МСК при аутологичной и аллогенной трансплантации кроветворных предшест-

венников для сокращения сроков приживления.

Однако, применение МСК при трансплантации ГСК может иметь ряд негативных последствий. В силу того, что МСК оказывают неспецифическое иммуносупрессивное действие, у пациентов, получающих терапию МСК, повышается риск развития вирусных, грибковых и бактериальных инфекционных заболеваний, а также, возможно, рецидива лейкоза в связи с ослаблением реакции «трансплантат против лейкоза».

Кроме того, остается неизвестным, оказывает ли терапия МСК значимое влияние на лейкозные клетки, которые даже в состоянии ремиссии, необходимы для проведения ТГСК, присутствующим в костном мозге в виде минимальной резидуальной болезни. В частности, на их чувствительность к противоопухолевой терапии, которая является важным прогностическим фактором. С одной стороны, МСК играют важную роль в поддержании гемопоэза и выделяют цитокины и ростовые факторы, стимулирующие пролиферацию и дифференцировку ГСК и бластных клеток костного мозга, а также улучшают приживление ГСК при трансплантации. Можно предположить, что МСК могут оказывать аналогичное действие на лейкозные клетки, которые являются гемопоэтиче-

скими предшественниками. С другой стороны, МСК оказывают антипролиферативные эффекты на лимфоциты.

В последнее время появляются работы, согласно которым, различные линии МСК могут оказывать антипролиферативные эффекты на лейкозные клетки, препятствовать апоптозу, индуцируемому химиопрепаратами и бессывороточной средой, повышать экспрессию антиапоптотических факторов, не изменяя экспрессию гена множественной лекарственной резистентности (MDR1), что может приводить к снижению чувствительности лейкозных клеток к химиотерапии *in vitro*.

Определение мезенхимальных стволовых клеток, их основные свойства

Существование в костном мозге, наряду со стволовыми кроветворными клетками, стволовых клеток стромы, образующих в культуре колонии фибробластоподобных клеток, было впервые показано Фриденштейном с соавторами, которые выделили фибробластоподобную популяцию, обладающую адгезивными свойствами, которая могла восстанавливать (регенерировать) зачатки кости *in vivo*. Эти клетки получили название колониеобразующих предшественников фибробластов (КОЕ-ф). Было показано, что КОЕ-ф имеют стволовую природу,

т.е. обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в различные мезенхимальные (адипогенную, хондрогенную, остеогенную) клеточные линии и немезенхимальные линии. Учитывая способность этих клеток к самоподдержанию и к дифференцировке в различные клеточные линии мезенхимы, Carlan ввел термин «мезенхимальные стволовые клетки» (МСК).

Международным обществом клеточной терапии (ISCT) были внесены некоторые поправки в номенклатуру: был введен термин «мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки» (МСК) и было определено, что не всегда МСК являются стволовыми клетками. Кроме того, в терминологию включали источник выделения МСК: выделенные из жировой ткани, выделенные из костного мозга и т.д. ISCT был выделен минимум критериев для определения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток:

- способность адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования;
- экспрессия молекул адгезии CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 или CD19 and HLA-DR;
- способность дифференцировки в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro*.

Кроме того, важным свойством МСК является их способность образовывать колонии веретенообразно-вытянутых клеток, по морфологии напоминающих фибробласты, при культивировании *ex vivo*.

Добавление различных факторов в среду для культивирования МСК может приводить к их дифференцировке.

В костном мозге недифференцированные МСК создают гемопоэтическое микроокружение для гемопоэтических стволовых клеток. Они продуцируют матриксные молекулы, включая фибронектин, ламинин и коллаген. МСК также экспрессируют лиганды для поверхностных молекул клеток гемопоэтических линий: внутриклеточные молекулы адгезии 1 и 2 типов, молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа, функционально-связанный антиген лимфоцитов 3 типа, молекула адгезии активированного лейкоцита. При совместном культивировании МСК формируют кластеры с ГСК, мегакариоцитами и остеобластными предшественниками, и обра-

зуют линиеспецифические колониеобразующие единицы из CD34+ клеток костного мозга в долговременных культурах. Кроме того, МСК секретируют цитокины, необходимые для дифференцировки ГСК.

Человеческие МСК экспрессируют человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) I класса, а под действием IFN- γ и II класса. При исследовании уровня экспрессии поверхностных молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) было показано, что МСК экспрессируют средние уровни молекул I класса, в то время как молекулы МНС II класса на поверхности клеток не выявлялись, и были обнаружены лишь внутриклеточные депозиты аллоантигенов II класса в клеточных лизатах при помощи Western blotting-метода, стимуляция γ -интерфероном (IFN- γ) повышала содержание молекул как II, так и I классов на поверхности клеток. Экспрессия молекулы HLA-I повышалась при дифференцировке МСК в клетки жировой, костной и хрящевой тканей, но экспрессия молекул II класса при этом не выявлялась.

В процессе изучения, МСК были выделены из различных тканей, включая жировую ткань, пуповинную кровь, фетальную печень, кровь, костный мозг и легкое.

Возможности применения МСК для клеточной терапии

При культивировании МСК *in vitro*, после нескольких пассажей МСК могут быть применены в клинике для клеточной терапии (рисунк 1). Однако, остается неизвестным, происходит ли изменение МСК при их культивировании и пассировании, возможно, пролиферация на пластике может приводить к фенотипическим и функциональным изменениям МСК, тем более, что даже отдельно взятые клоны МСК отличаются друг от друга по экспрессии генов, фенотипу, способности к дифференцировке и экспансии.

Направления клеточной терапии, связанные с основными свойствами МСК, могут быть разделены на три группы.

1. Поддержка кроветворения при котрансплантации с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК).
2. Замещение и восстановление функции поврежденных негемопоэтических тканей (кости, хряща, скелетных мышц, сердечной мышцы, нервной ткани, печени и др.).
3. Подавление иммунных конфликтов при аллогенной неродственной трансплантации и тяжелых аутоиммунных процессах.

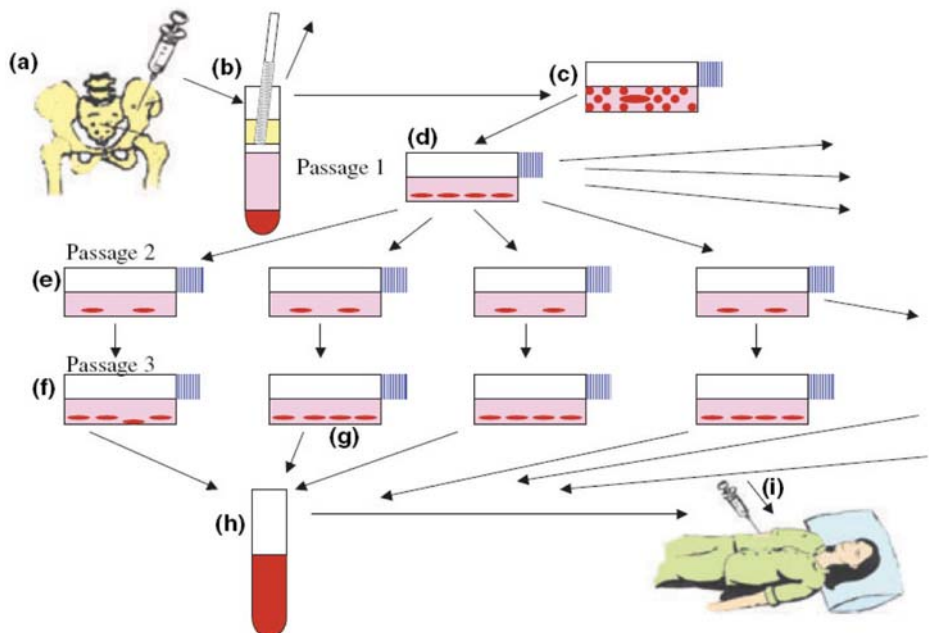


Рисунок 1. Выделение МСК и их применение для исследовательской работы и в клинике. (а) Аспирация костного мозга, (б) выделение мононуклеарных клеток по градиенту плотности, (с) культивирование клеток во флаконах в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку. (д) Когда клетки покрывают больше 70% поверхности чашки, их снимают при помощи раствора трипсина и (е, ф) снова высаживают на чашки при меньшей плотности, (г-и) снятие клеток с чашек и использование для клеточной терапии [67].

На двух направлениях для использования МСК: для поддержания гемопоэза и подавления иммунных конфликтов, — мы остановимся более подробно позже.

Второе направление для использования МСК возможно благодаря тому, что МСК проявляют себя как мультипотентные клетки *in vivo*. Было показано, что после введения новорожденным мышам или инфузии *in utero*, клетки внедряются в различные органы и в них происходит специфическая для данной ткани дифференцировка МСК. После внутривенного введения МСК в небольшом количестве могут быть обнаружены в различных тканях, при этом МСК внедряются преимущественно в очаги повреждения. МСК восстанавливают не только мезенхимальные линии тканей такие, как хрящ межпозвоночных дисков, кость, кардиомиоциты, связки, но и онтогенетически менее родственные ткани: нервную ткань, эпителиальную ткань кожи, легкого, печени, кишечника, почек и селезенки. Кроме того, внутривенное введение МСК ускоряло регенерацию поврежденных легких, нервной ткани и почек у экспериментальных животных в основном благодаря паракринным механизмам и изменению продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в области повреждения. Кроме того, можно применять МСК для лечения токсических осложнений химиотерапии таких, как радиационный гастроэнтерит и геморрагический цистит.

Котрансплантация МСК с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) и роль МСК в поддержании гемопоэза

Это направление клеточной терапии связано с основными свойствами МСК: способностью формировать стромальное микроокружение кроветворного костного мозга; обеспечивать прикрепление кроветворных клеток и снабжение их необходимыми цитокинами и ростовыми факторами; участвовать в строительстве и васкуляризации костного плацдарма. Изначально, основной функцией МСК считалось поддержание гемопоэза. При последующих исследованиях было показано, что человеческие МСК усиливают приживание неродственных выделенных из пуповинной крови ГСК у NOD-SCID мышей и эмбрионов овцы. Усиливающий эффект выявлялся лучше всего при небольшом количестве

ГСК и распространялся на клетки миелоидной, лимфоидной и мегакариоцитарной линий. В исследовании Maitra и соавторов у 2 из 10 мышей приживание происходило при небольшом количестве ГСК, в то время как у 8 из 10 мышей значительное приживание наблюдалось при котрансплантации клеток пуповинной крови и МСК. Механизм усиления приживания ГСК при действии МСК *in vivo* не известен. Один из возможных механизмов — это усиление хоминга и пролиферации ГСК под действием выделяемых в кровотоке цитокинов, что, однако, может не приводить к хомингу МСК в костный мозг. В некоторых исследованиях наблюдались усиливающие эффекты, но МСК при этом в костном мозге не обнаруживались.

Таким образом, результаты доклинических испытаний котрансплантации МСК с кроветворными стволовыми клетками на экспериментальных моделях позволили прийти к следующим заключениям:

- Трансплантация МСК ускоряет и улучшает приживание гемопоэтических стволовых клеток (ГСК);
- Действие МСК, стимулирующее приживание и пролиферацию ГСК, не является линейно-специфическим, способствует в равной мере пролиферации миелоидных и лимфоидных клеток;
- Действие МСК реализуется через высвобождение цитокинов, регулирующих приживание (SDF1), пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток (GM-CSF, G-CSF, SCF, IL-6) и иммуносупрессивный эффект (Активин-А) [1].

Эти данные явились основанием для клинического использования МСК вместе с ГСК с целью повышения эффективности трансплантации гемопоэтической ткани.

Клинические испытания подтвердили, что МСК могут быть выделены в достаточном количестве из аспирата костного мозга и после 4–7 пассажей в культуре введены пациенту в количестве до 50×10^6 без осложнений и побочных эффектов. При этом МСК могут быть выделены в достаточном количестве из аспирата костного мозга реципиентов в различные сроки после трансплантации, демонстрируют черты частичного, а чаще полного химеризма.

Исследования, проведенные на достаточно большом контингенте больных

со злокачественными и незлокачественными заболеваниями, показали, что котрансплантация ГСК с МСК, выращенными в культуре (4–7 пассажей) и введенными внутривенно в количестве $1,0–5,0 \times 10^6$, приводила к ускорению приживания ГСК, восстановлению показателей периферической крови (абсолютное число нейтрофилов и тромбоцитов), а также к снижению частоты и интенсивности острой и хронической РТПХ.

Иммуномодулирующие свойства МСК и их применение для лечения иммуноконфликтных состояний

МСК обладают иммуносупрессивными свойствами и способны уменьшать воспаление. Человеческие МСК подавляют аллореактивность лимфоцитов *in vitro* в смешанных культурах лимфоцитов (MLC), благодаря HLA (человеческий лимфоцитарный антиген)-независимым механизмам.

Взаимодействие МСК и лимфоцитов *in vitro*

МСК экспрессируют маркеры, характерные для эпителия тимуса, и молекулы адгезии, необходимые для взаимодействия с Т-клетками. При отсутствии иммуносупрессии или механизмов, вызывающих иммунную толерантность, аллогенные клетки отторгаются иммунной системой. Клетки, экспрессирующие МНС молекулы и подходящие костимулирующие молекулы, стимулируют Т-клетки только прямым путем. Человеческие МСК не экспрессируют молекулы CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) или CD40, даже после стимуляции IFN- γ . Аллогенные клетки могут также активировать Т-клетки опосредованно, когда МНС антигены презентуются антиген-презентирующими клетками (АРС). Недифференцированные МСК, МСК, экспрессирующие аллоантигены II класса после воздействия IFN- γ и МСК, дифференцированные в адипоциты, остеоциты и хондроциты, не могут индуцировать пролиферацию аллогенных лимфоцитов даже в присутствии APC или после проведения костимулирующих сигналов с использованием CD28-специфических антител и CD80 или CD86 генной трансдукции. Показателем аллореактивности лимфоцитов может служить продукция активированными лимфоцитами IFN- γ . МСК не стимулируют продукцию IFN-

γ мононуклеарными клетками периферической крови. В присутствии МСК снижалась экспрессия маркеров, связанных с активацией лимфоцитов: CD25 (IL-2-стимулирующий рецептор), CD38 и CD39. Однако, под действием МСК все-таки наблюдался прайминг лимфоцитов. При совместном культивировании Т-клеток и МСК и последующем культивировании Т-клеток с неразделенной культурой лимфоцитов, выделенных у доноров МСК, активация Т-клеток была практически аналогична таковой при культивировании только с лимфоцитами, выделенными от того же донора.

Мезенхимальные стволовые клетки не только не активируют CD4+, но также не подвергаются лизису CD8+ цитотоксическими лимфоцитами. Даже несортированные лимфоциты, стимулированные *in vitro* РВМС (мезенхимальные клетки периферической крови), выделенными из специфического донора, лизируют только лимфоциты, но не МСК, выделенные у того же донора. Дальнейшие исследования показали, что МСК запускают abortивную программу активации в полностью дифференцированных CD8+ Т-клетках, при этом главные эффекторные функции не активируются. Кроме того, МСК не подвергаются специфическому лизису NK-клетками.

Взаимодействие МСК и Т-лимфоцитов

МСК обладают иммуносупрессивными свойствами и ингибируют ответ наивных Т-клеток и клеток памяти в смешанной лимфоцитарной культуре (СКЛ) и культуре, индуцированной митогенами. Супрессия не зависит от МНС и наиболее выражена, если МСК добавляют в первый день 6-дневной культуры. Степень супрессии является дозозависимой. Значительное ингибирование наблюдается, когда используется большое количество МСК (МСК: лимфоциты > 1:10). При добавлении меньшего количества МСК (1:100–1:10000) пролиферация Т-клеток усиливалась. Супрессивный эффект МСК сохранялся и при их дифференцировке в остециты, адипоциты и хондроциты, и усиливался при предшествующей обработке IFN-γ. Супрессивные эффекты человеческих МСК проявлялись при разделении МСК и лимфоцитов при помощи проницаемой мембраны.

Субпопуляцию наивных CD4+ Т-клеток, экспрессирующих CD25, называют регуляторными Т-клетками, они имеют потенциальную супрессорную активность. МСК увеличивают количество CD4+CD25hi, CD4+CTLA4+ и CD4+CD25+CTLA4+ клеток среди стимулированных IL-2 лимфоцитов и в MLC (смешанной лимфоцитарной культуре) (рисунк 2).

Под действием МСК снижалась экспрессия CXCR4, 5 и CCR7. При соотношении МСК:лимфоциты 1:10 МСК стимулировали секрецию антител В-клетками.

Количество CD25+ и CD38+ клеток в митоген-стимулированной культуре лимфоцитов уменьшалось в присутствии МСК. Деплеция CD25+ до стимуляции митоген-активированными моноци-

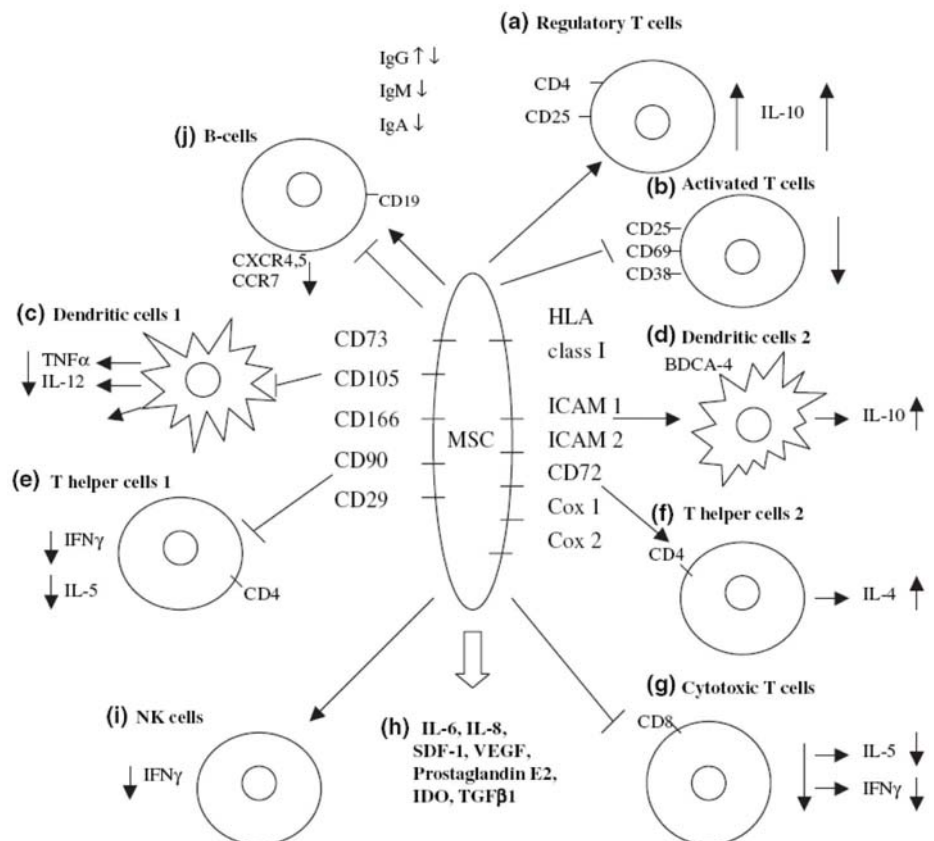


Рисунок 2. Влияние МСК на клетки иммунной системы.

- МСК увеличивают соотношение CD4+CD25+ клеток и продукцию IL-10.
- МСК уменьшают экспрессию маркеров активации Т-клеток, CD25, CD69 и CD38. МСК замедляют созревание АПС и уменьшают экспрессию HLA-DR.
- Дендритные клетки 1 типа снижали продукцию TNF-α и IL-12 при культивировании с МСК.
- МСК повышают секрецию IL-10 ЛПС-стимулированными дендритными клетками 2 типа, снижают секрецию IL-5 CD4+-клетками.
- Образование IFN-γ Th1-клетками значительно снижалось под действием МСК.
- МСК ингибируют смешанные культуры лимфоцитов и последующее развитие цитотоксических Т-клеток благодаря растворимым факторам.
- Растворимые факторы, вырабатываемые МСК, IL-6, IL-8, фактор роста стволовых клеток 1 (SDF1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). К растворимым факторам, ингибирующим активацию Т-клеток, относят простагландин E2, индуцирующий регуляторные Т-клетки, индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), образование IDO стимулируется IFN-γ, IDO катализирует превращение триптофана в кинуренин, и ингибирует Т-клеточный ответ путем деплеции триптофана. К растворимым факторам, ингибирующим Т-клеточный ответ, относятся TGFβ1, фактор роста гепатоцитов.
- При культивировании с МСК чистой культуры NK-клеток значительно снижалось образование IFN-γ.
- МСК снижали пролиферацию В-клеток и секрецию иммуноглобулинов В-клетками при соотношении МСК:лимфоциты 1:1.

тами не влияет на способность МСК ингибировать пролиферацию Т-клеток. МСК также продуцируют костный морфогенный протеин-2, который вызывает иммуносупрессию посредством образования CD8+ регуляторных Т-клеток.

В присутствии стимуляторов образования Т-хелперов 1 типа (Th1) таких, как CD3, CD28, IL-4, IL-2 и IL-12, наивные Т-клетки превращаются в клетки, секретирующие IFN- γ . В присутствии МСК, секреция IFN- γ снижалась (рисунк 2). МСК стимулируют Th2 дифференцировку. При добавлении в MLC (САК) мезенхимальные стволовые клетки уменьшали лизис под действием CD8+ Т-клеток, а при добавлении МСК в цитотоксической фазе цитотоксический эффект не проявлялся. МСК могут ингибировать аллореактивный процесс и предотвращать развитие цитотоксических Т-клеток, однако, при активации цитотоксических Т-клеток, МСК неэффективны.

Человеческие МСК подавляют развитие CD4+ и CD8+ Т-клеток благодаря растворимым факторам. Факторы, оказывающие супрессорное действие (предполагается, что их несколько), вырабатываются МСК не постоянно, так как супернатанты культуры МСК не подавляют пролиферацию Т-клеток (рисунк 2). Пролиферация чистой культуры Т-клеток частично восстанавливается при добавлении антител против фактора роста гепатоцитов и трансформирующего ростового фактора β 1 (TGF β 1). Некоторые авторы считают, что основную роль играют IFN- γ , IL-10, фактор некроза опухоли (TNF- γ) и IL-2. Liu и соавторы показали, что антитела, специфичные к FasL и TGF β 1, ослабляют супрессивное действие МСК на стимулированные конканавалином А смешанные лимфоцитарные колонии, эффект был дозозависимым, антитела к IL-10 эффекта не оказывали. МСК могут ингибировать пролиферацию Т-клеток путем продукции индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). Образование IDO стимулируется IFN- γ , IDO катализирует превращение триптофана в кинуренин, и ингибирует Т-клеточный ответ путем деплеции триптофана. IFN- γ оказывает дозозависимый стимулирующий эффект на активность IDO. Добавление триптофана восстанавливает пролиферацию Т-клеток, предполагают, что активность IDO может действовать как эффекторный механизм ингибирования

Т-клеток. Активация регуляторных Т-клеток может происходить под действием простагландина E₂ (PGE₂), который синтезируется под действием фермента циклооксигеназы (ЦОГ). МСК постоянно вырабатывают ЦОГ-1 и ЦОГ-2. При совместном культивировании Т-клеток с МСК, повышалась продукция ЦОГ-2 и PGE₂. Ингибиторы синтеза PGE₂ сохраняли пролиферацию фитогемагглютин-активированных (ФГА) лимфоцитов при культивировании с МСК.

Tse и соавторы исследовали аллореактивные лимфоциты и сравнили их с митоген-стимулированными культурами. Полученные результаты говорили о том, что продукция МСК IL-10, TGF β , PGE₂ и деплеция триптофана не играли роли в супрессии смешанных лимфоцитарных культур.

В противоречивости результатов может быть несколько причин. Tse и соавторы исследовали культуры неразделенных мононуклеарных клеток-респондеров, в других исследованиях использовали чистую культуру Т-клеток. Ранее было показано, что результаты изменяются в зависимости от способа активации лимфоцитов. При культивировании МСК с MLC в лимфоцитах повышалась транскрипция и трансляция IL-2 и растворимых рецепторов к IL-2, после митогенной стимуляции лимфоцитов уровни экспрессии снижались. При добавлении МСК к культуре лимфоцитов, в MLC повышалась секреция IL-10, в ФГА-стимулированных культурах не изменялась. Добавление индометацина, ингибирующего синтез PGE₂, частично восстанавливало ингибирующий эффект МСК на ФГА-стимулированные лимфоциты, но не MLC.

Степень проявления иммуномодулирующих свойств МСК варьируема. Противоречивость результатов может быть объяснена использованием различных культур лимфоцитов, различием условий и кинетики. Как было сказано ранее, существуют видоспецифические различия. Могли изменяться дозы МСК. В некоторых исследованиях соотношение МСК:лимфоциты \geq 1:1, в то время как в большинстве исследований клетки используют в соотношении 1:10. В исследованиях зависимости эффектов МСК от количества большие количества МСК оказывали иммуносупрессивные эффекты, в то время как небольшие количества МСК иногда даже усиливали

пролиферацию лимфоцитов. Как бы то ни было, соотношение МСК:лимфоциты 1:10 in vitro значительно отличается от физиологического, так как содержание МСК в костном мозге меньше 1:10 000 мононуклеарных клеток. Таким образом, большее количество МСК, необходимое для получения эффекта, является чрезмерным для экспериментов in vivo и терапевтического применения.

Влияние МСК на антиген-презентирующие клетки

МСК уменьшают активацию Т-клеток опосредованно через уменьшение образования дендритных клеток (DC) из моноцитов. Кроме того, МСК ингибируют дифференцировку и функционирование образуемых из моноцитов дендритных клеток в трансвелл-системах. После удаления МСК ингибирующий эффект не наблюдался. МСК снижали позитивную регуляцию CD1A, CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), HLA-DR и повышали регуляцию CD83 при созревании DC. Важно, что DC, выделенные из культур, культивируемых с МСК имели более низкую способность активировать CD4+ в СКЛ (MLC).

Мезенхимальные стволовые клетки уменьшали секрецию IFN- γ , IL-12 и TNF- α дендритными клетками, при этом продукция супрессорного цитокина IL-10 повышалась (рисунк 2). TNF- α ингибирует созревание DC, их миграцию и способность стимулировать аллореактивные Т-клетки и, кроме того, может играть роль в индукции иммуносупрессивных эффектов МСК. Похожим образом, мышинные стромальные клетки селезенки увеличивали образование IL-10 и уменьшали образование IFN- γ дендритными клетками, демонстрируя тем самым, что МСК, дифференцированные в стромальные клетки, имеют аналогичные свойства. CD14+ моноциты активируют секрецию МСК растворимых факторов, включая IL-1 β , который ингибирует аллореактивные Т-клетки. Скорее всего, эффекты МСК на АПС приводят к ингибированию активации Т-клеток.

Эффекты МСК на NK-клетки

МСК уменьшают секрецию IFN- γ NK-клетками, стимулированными IL-2 (рисунк 2). МСК не ингибируют лизис K562 клеток NK-клетками. При соотношении МСК:лимфоциты 1:1 наблюдалось ингибирование цитотоксической функции CTL и NK-клеток, данные эф-

фекты не сохранялись при соотношении 1:10. Таким образом, можно предположить, что только высокие дозы МСК могут уменьшить экспансию CD8+ Т-клеток и NK-клеток. Однако, столь высокие концентрации МСК не могут быть применены *in vivo*.

Влияние МСК на В-лимфоциты

МСК могут ингибировать пролиферацию лимфоцитов, индуцированную митогенами В-клеток, митогеном фитолакки и протеином А *Staphylococcus aureus*. Тем не менее стимуляция лимфоцитов митогеном фитолакки зависит от Т-клеток, и протеин А стимулирует пролиферацию Т- и В-клеток. Поэтому нельзя разделить пролиферацию В-клеток и Т-клеток. МСК ингибировали стимуляцию В-клеток благодаря растворимым факторам анти-CD40 и анти-IL-4. Проллиферация В-клеток останавливалась в фазе G0/G1 клеточного цикла, апоптоза при этом не наблюдалось. При добавлении МСК к активированной чистой культуре В-клеток в соотношении 1:1, снижались количество Ig-продуцирующих клеток и уровни IgM, IgG и IgA, при уменьшении количества МСК данные эффекты не наблюдались. МСК не снижали продукцию TNF- α , IFN- γ , IL-4 и IL-10. МСК снижали продукцию рецепторов CXCR4, CXCR5 и CCR7B к хемокинам, а также хемотаксис к CXCL12 CXCR4-лиганда, CXCR5-лиганда к CXCL13, возможно, большие количества МСК могут действовать на хемотаксические свойства В-клеток. При концентрации МСК в 10 раз ниже концентрации лимфоцитов происходила стимуляция В-клеток крови и селезенки, приводящая к продукции IgG в *Elispot*. При разделении МСК и клеток селезенки при помощи полупроницаемой мембраны, стимуляция продукции IgG происходила в нефракционированных клетках селезенки, но не в обогащенных В-клетках. Таким образом, активация В-клеток МСК может происходить под действием растворимых факторов, продуцируемых обкладочными клетками. МСК могут как ингибировать, так и стимулировать В-клетки, в зависимости от дозы, источника для выделения МСК и тест-системы (рисунки 2). Эти результаты могут противоречить потенциальному использованию МСК для лечения аутоиммунных забо-

леваний, при развитии которых основную роль играют В-клетки. Ингибирование В-клеток *in vitro* происходило при высоких дозах МСК, которые могут быть не безопасны для терапевтического использования. В меньших дозах МСК активировали В-клетки.

Иммуномодулирующие свойства МСК *in vivo* и их терапевтическое значение

Иммуномодулирующие эффекты МСК исследованы на различных животных моделях при аллореактивных иммунных процессах (трансплантация органов и стволовых клеток), аутоиммунных процессах или противоопухолевом иммунитете. Одно из первых исследований *in vivo* показало, что инфузия аллогенных МСК, выделенных из костного мозга павиана, продлевала выживаемость аллогенных кожных трансплантатов до 11 дней в сравнении с 7 днями у животных, не получающих МСК. Кроме того, было показано, что инфузия сингенных МСК хозяина приводила к снижению отторжения аллогенных трансплантатов стволовых клеток на мышинных моделях аллогенной трансплантации костного мозга, хотя иммунологические механизмы, лежащие в основе этих наблюдений, не были объяснены.

Один из наиболее ярких эффектов МСК наблюдается при лечении болезни «трансплантат против хозяина» после аллогенной ТГСК. Системное введение выращенных в культуре МСК, выделенных из жировой ткани, позволяло снизить летальность от РТПХ у мышей, которым проводилась трансплантация ГСК от гаплоидентичного донора. Это исследование показало, что только ранняя инфузия МСК после трансплантации была эффективна для контроля БТПХ. Более того, предполагалось, что только повторные инфузии МСК могут приводить к уменьшению проявлений РТПХ и это может объяснить последние наблюдения, при которых однократное введение МСК одновременно с ТГСК не влияло на частоту развития и серьезность РТПХ у мышей.

В исследовании Zappia и соавторов мышинные МСК уменьшали проявления экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита, на модели человеческого рассеянного склероза, путем индукции толерантности периферических Т-клеток против патогенных антигенов. Инфузия МСК была эффективна толь-

ко при введении в начале и в период разгара болезни (пика). В противоположность, инфузия МСК была неэффективна при коллаген-индуцированном артрите (КИА) при работе на мышинных моделях ревматоидного артрита (РА).

Wu и соавторы показали, что при трансплантации сердца у крыс хоминг МСК происходил в области отторжения трансплантата.

Djouad и соавторы показали, что МСК предотвращают отторжение аллогенных опухолевых клеток у иммунокомпетентных мышей. При системном введении МСК или при введении подкожно одновременно с В16 клетками меланомы происходило формирование опухолей, в то время как клетки меланомы, вводимые без МСК, элиминировались иммунной системой хозяина. Кроме того, МСК оказывали защитные эффекты на ткани на моделях ишемии/реперфузии крысиной почки, возможно, обусловленные секрецией растворимых иммуномодулирующих факторов. Инфузия крысиных МСК на экспериментальных крысиных моделях гломеруло-нефрита приводила к ускорению восстановления гломерул, возможно, связанному с высвобождением ростовых факторов. В один ряд с этими исследованиями можно поставить исследования, показывающие, что приживление МСК происходит преимущественно в области повреждения или опухолевого роста.

Иммуносупрессивные свойства МСК представляют огромный интерес для трансплантации органов и ГСК для предотвращения отторжения трансплантата и РТПХ после трансплантации. Первые клинические исследования были проведены с целью оценки безопасности инфузии МСК. Клинические исследования, проведенные на больных раком легкого, показали, что инфузия МСК была безопасной и приводила к быстрому восстановлению гемопоэза. В мультицентровом клиническом исследовании, выращенные в культуре МСК, выделенные из костного мозга HLA-идентичных сиблингов вводились одновременно с HLA-идентичными ГСК 46 пациентам, перенесшим аллогенную ТГСК после миелоаблативных режимов кондиционирования. МСК вводились за 4 часа до инфузии ГСК, при этом побочных эффектов, связанных с инфузией, эктопического формирования ткани или повышения частоты возникновения

или тяжести РТПХ не наблюдалось. Также не наблюдалось ускорения приживления ГСК или отсутствия признаков отторжения трансплантата.

В Европейском мультицентровом исследовании I–II фазы принимали участие 13 детей, перенесшие ТГСК от гаплоидентичного донора в сочетании с трансплантацией МСК, выделенных у того же донора. Побочных эффектов сразу после введения МСК не наблюдалось, в то время как отторжение трансплантата в контрольной группе наблюдалось у 20% из 52 пациентов, у всех пациентов, получивших МСК, наблюдалось приживление и ускоренное восстановление лейкоцитарного пула в периферической крови, при этом скорость восстановления числа тромбоцитов и нейтрофилов не отличалась от контрольной группы. Кроме того, потенциальные преимущества терапии МСК были показаны при описании клинических случаев. По результатам этих клинических случаев можно говорить не только об использовании МСК для профилактики развития РТПХ, но и о лечении РТПХ кишечника после ТГСК. Были описаны случаи лечения острой и хронической БТПХ при помощи МСК. Побочных эффектов после введения МСК не наблюдалось. Из 40 пациентов с тяжелой острой БТПХ у 19 наблюдалось полное выздоровление, у 9 – улучшение состояния, у 7 пациентов не наблюдалось ответа на терапию, у 4 наблюдалась стабилизация заболевания, состояние 1 пациента не было оценено из-за короткого периода наблюдения. 21 пациент выжил в течение периода от 6 недель до 3,5 лет после трансплантации. У 9 из них наблюдалась экстенсивная хроническая БТПХ. В двух проспективных рандомизированных европейских исследованиях III фазы изучалось использование МСК для лечения и профилактики острой БТПХ после аллогенной ТГСК.

Механизмы, лежащие в основе иммуномодулирующих эффектов МСК *in vivo*, в настоящий момент активно обсуждаются. Выделить МСК из костного мозга реципиентов, получивших ТГСК, очень сложно. Это может быть связано с тем, что МСК мигрируют в другие ткани и органы, где осуществляют иммуносупрессивные эффекты. Исследования на животных показали, что МСК мигрировали в лимфоидные органы и приживление МСК происходило в участки по-

вреждения тканей или опухолевого роста. В нескольких исследованиях было показано, что МСК после системного введения мигрируют неспецифически в капиллярное русло различных тканей и органов, преимущественно легких. Интересно, что исследование на мышцах показало, что экспансия МСК *ex vivo* значительно уменьшает их способности к хомингу и приживлению.

Влияние МСК на пролиферацию, апоптоз, чувствительность лейкоэмических клеток к химиотерапии

В ряде исследований, упомянутых ранее, было показано, что МСК оказывают антипролиферативные эффекты на клетки иммунной системы. Однако, по мнению ряда авторов, антипролиферативные эффекты МСК этим не ограничиваются и наблюдаются также при воздействии МСК на клетки других органов и тканей, включая гемопоэтические и негемопоэтические опухолевые линии клеток.

При сравнении пролиферации, чувствительности к химиотерапии и уровня экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (MDR1) в лейкоэмических клетках линии K562 до и после культивирования с МСК, были получены следующие результаты: совместное культивирование с МСК и наличие прямых межклеточных контактов приводило к подавлению роста и пролиферации K562 (увеличивалось количество лейкоэмических клеток в фазе G0/G1, уменьшалось количество клеток в фазе S), усилению резистентности к химиотерапии клеток K562 (количество клеток K562 в состоянии индуцированного дауномицином апоптоза в культуре с МСК было меньше, чем в суспензии K562). Однако, экспрессия гена MDR1 в культуре с МСК не изменялась. Похожие результаты, свидетельствующие о подавлении пролиферации лейкоэмических клеток при совместном культивировании со стромальными клетками описаны в работах 2009 года. Было показано, что МСК оказывают ингибирующий эффект на пролиферацию лейкоэмических клеток линии K562. Рассматривалась роль молекулы DKK-1 (*dickkopf-1*), секретируемой МСК и являющейся негативным регулятором WNT сигнальных путей, в ингибировании пролиферации. При нейтрализации DKK-1 анти-DKK-1 антителами или при снижении экспрессии гена DKK-1, ин-

гибирующий эффект МСК на пролиферацию лейкоэмических клеток линии K562 уменьшался. Экспрессия DKK-1 МСК регулируется NANOG, транскрипционным фактором, вырабатываемым в некоторых стволовых клетках. Было показано, что МСК могут ингибировать пролиферацию K562 в гуморальном микроокружении. Тот же эффект наблюдался в первичных лейкоэмических гемопоэтических предшественниках, выделенных у пациентов.

В исследовании 2002 года было показано, что стромальные клетки предотвращают апоптоз миелобластных клеток за счет повышения экспрессии генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в них. В клетках линий HL-60 и NB-4 при совместном культивировании со стромальными клетками линии MS-5 снижались уровни апоптоза, индуцируемого бессывороточной средой и Ага-С. Этот же эффект наблюдался при культивировании лейкоэмических клеток в кондиционированной MS-5 клетками среде и частично сохранялся, когда лейкоэмические клетки были отделены от стромальных при помощи микропористой мембраны. Совместное культивирование повышало экспрессию гена Bcl-2 в лейкоэмических клетках. В 57 образцах при совместном культивировании повышался также уровень экспрессии Bcl-XL. В клетках пациентов, резистентных к индукционной терапии, при культивировании со стромальными клетками значительно повышалась экспрессия Bcl-2, однако, в клетках пациентов, чувствительных к химиотерапии, столь значимого повышения не отмечалось. Похожие результаты, свидетельствующие об уменьшении индуцированного даунорубицином (DNR) апоптоза лейкозных клеток U937, вероятно, за счет повышения в них экспрессии генов, связанных с апоптозом, в первую очередь Bcl-XL, под действием МСК, были получены Lin Y.M. и соавторами в 2006 году. Помимо снижения уровня индуцируемого DNR апоптоза, наблюдалось снижение пролиферации U937 (человеческих клеток миеломоноцитарной лейкемии) под действием МСК, выделенных из костного мозга здоровых доноров, – увеличивалось количество клеток в фазах G0/G1, количество клеток в фазах G2/M уменьшалось, в сравнении с чистой культурой U937. Из 487 генов, связанных с апоптозом, при инкубации с

МСК изменялась экспрессия 39. Среди 37 активированных генов наиболее активно экспрессировался ген Bcl-X_L. Экспрессия двух генов снижалась. Совместное культивирование с МСК не индуцировало образование MDR1 мРНК в клетках U937.

В исследовании 2003 года проводилось совместное культивирование лейкемических клеток линии HL-60 с HFCL (human bone marrow fibroblastoid stromal cell line – человеческие фибробластоподобные стромальные клетки). Клетки культивировали в трансвелл-системах и при непосредственном контакте культур, без разделения. Исследование показало, что совместное культивирование с HFCL ингибирует пролиферацию HL-60, в сравнении с чистой культурой HL-60. При совместном культивировании с HFCL снижались митотический индекс культуры HL-60, экспрессия ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) HL-60-клетками, в сравнении с чистой культурой HL-60. Кроме того, процент клеток HL-60 в G1-фазе при совместном культивировании с HFCL был выше, чем в культуре без HFCL, а процент клеток в S-фазе был ниже. Также было показано, что совместное культивирование с HFCL подавляет экспрессию VEGF в клетках HL-60.

При изучении эффектов линии человеческих фибробластоподобных стромальных клеток (HFCL) на пролиферацию, дифференцировку и чувствительность к химиотерапии AML-клеток (линий U937, HL-60 и мультирезистентной культуры (MDR) HL60/VCR) культивирование клеточных линий производилось аналогичным образом: при непосредственном контакте с клетками линии HFCL или при разделении при помощи трансвелл-системы. Было показано, что HFCL подавляют пролиферацию лейкозных клеток, в сравнении с чистой культурой AML-клеток (процент лейкемических клеток в фазе G1 был выше при совместном культивировании с HFCL, нежели в чистой культуре, а процент клеток в S фазе был ниже). Также было показано, что HFCL могут индуцировать дифференцировку моноцитов при совместном культивировании: несколько увеличивалось количе-

ство NBT-положительных клеток и повышалась экспрессия CD11b и CD14.

HFCL могут препятствовать ТРТ-индуцированному апоптозу HL-60 и HL-60/VCR клеток за счет модуляции Bcl-2 и активированной каспазы 3 типа. При терапии ТРТ HL-60 и HL-60/VCR клетки имели морфологические признаки, характерные для апоптоза, увеличивались отношение G0/G1 HL-60 и HL-60/VCR клеток и количество клеток в фазе sub-G1. Процент Annexin V-положительных клеток и апоптотических клеток увеличивался при экспрессии активированной каспазы-3 и снижении экспрессии Bcl-2. При культивировании с HFCL клетками, процент Annexin V-положительных клеток, апоптотических клеток уменьшался, а также уменьшалось количество клеток в фазе sub-G1. После культивирования с HFCL в трансвелл-системе экспрессия активированной каспазы-3 снижалась, а экспрессия Bcl-2 повышалась.

При культивировании с HFCL без разделения в течение 96 часов, в HL-60 клетках повышалась экспрессия 582 генов и снижалась экспрессия 1323 генов по меньшей мере в два раза (данные были получены при помощи Affymetrix GeneChip Human Genome U133 set A). Изменение экспрессии некоторых генов было выявлено при помощи RT-PCR и northern blot.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что различные линии МСК могут оказывать антипролиферативные эффекты на лейкозные клетки, препятствовать апоптозу, индуцируемому химиопрепаратами и бессывороточной средой, повышать экспрессию антиапоптотических факторов, не изменяя экспрессию MDR1, что может приводить к снижению чувствительности лейкозных клеток к химиотерапии *in vitro*.

Как подобные эффекты будут проявляться *in vivo* и влиять на прогноз пациентов, получающих терапию МСК, остается не известным. Однако, в последнее время появляются работы, говорящие о том, что при котрансплантации МСК и ГСК увеличивается частота рецидивов лейкоза у пациентов со злокачественными заболеваниями крови. (Ning H. et al., 2008).

Литература

1. Владимирская Е.Б. Механизмы кроветворения и лейкемогенеза: Цикл лекций / Е.Б. Владимирская. – М.: Династия, 2007. – 152 с.
2. Ding Y., Lu H., Lu S.F., Lu R.N., Liu P., Wu Y.J., Li J.Y. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation and apoptosis of k562 cells // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2009. – Vol. 17, N.1. – P. 137–40.
3. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., Ljungman P., L'nnies H., Nava S., Ringden O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells // *Leukemia.* – 2007. – Vol. 21, N.8. – P. 1733–8. Epub. 2007 May 31.
4. Liang R., Huang G.S., Wang Z., Chen X.Q., Bai Q.X., Zhang Y.Q., Dong B.X., Wang W.Q. Effects of human bone marrow stromal cell line (HFCL) on the proliferation, differentiation and apoptosis of acute myeloid leukemia cell lines U937, HL-60 and HL-60/VCR // *Int. J. Hematol.* – 2008. – Vol. 87, N.2. – P. 152–66.
5. Ning H., Yang F., Jiang M., Hu L., Feng K., Zhang J., Yu Z., Li B., Xu C., Li Y., Wang J., Hu J., Lou X., Chen H. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study // *Leukemia.* – 2008. – Vol. 22, N.3. – P. 593–9. Epub. 2008 Jan 10.
6. Rasmuson I., Le Blanc K., Sundberg B., Ringden O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells // *Scand. J. Immunol.* – 2007. – Vol. 65. – P. 336–43.
7. Welniak L.A., Blazar B.R., Murphy W.J. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 139–170.
8. Zhu Y., Sun Z., Han Q., Liao L., Wang J., Bian C., Li J., Yan X., Liu Y., Shao C., Zhao R.C. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1 // *Leukemia.* – 2009. – Jan 15. doi: 10.1038/leu.2008.384