

# НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

## КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

### Успешное получение бластоцист человека методом SCNT

Вопрос клонирования животных и человека, несмотря на морально-этические противоречия, находит все больше заинтересованных исследователей. Как правило, официальная цель подобных исследований озвучивается как получение пациент-специфичных линий стволовых клеток, а идея создания истинного клона человека не афишируется. В настоящее время получены клоны целого ряда млекопитающих [1–3], однако исследования в области клонирования человека пока еще малочисленны. Это связано не только с этическими ограничениями, но и с проблемами в оформлении соответствующей документации и разрешений на работу с яйцеклетками человека.

Уже были предприняты первые шаги по созданию эмбрионов человека «альтернативным путем». В частности, воспроизведены ранние стадии эмбриогенеза (до бластоцисты) с использованием в качестве клеток-доноров т. н. «кариопласта», линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека [4], фетальных фибробластов [5]. Однако успешность результатов не была подтверждена методами генного анализа.

Основным методологическим направлением, применяющимся для реализации идеи клонирования, является перенос ядра (nuclear transfer, NT), суть которого состоит в объединении ядра донорской клетки (кариопласта) с цитоплазмой овоцита II деления мейоза (цитопластом). В соответствии с этим протокол NT включает ряд обязательных этапов: знуклеирование овоцита, подготовку донорского ядра, перенос его в цитопласт, а также активацию, инициирующую эмбриональное развитие [6]. Каждый шаг последовательности может быть выполнен с помощью различных методик. Например, введение генетического материала клетки-донора ядра в цитоплазму овоцита II порядка потенциально осуществимо как клеточным слиянием, так и микроинъекцией ядра [7].

В январе 2008 года в он-лайн версии журнала *Stem Cells* опубликованы материалы исследования А.Д. French с соавт. о клонировании человека. В этой работе в качестве источника ядра использовали соматические клетки взрослого человека – фибробласты кожи. Иными словами, эксперимент выполнен посредством метода переноса ядра соматической клетки (somatic cell nuclear transfer, SCNT), который ранее был успешно проведен в работе по клонированию приматов [3].

В исследовании использовались 29 зрелых овоцитов II деления мейоза, знуклеация которых производилась двумя разными способами: экструзией и аспирацией. Первый способ заключается в том, что заостренной стеклянной микропипеткой осуществлялось «выдавливание» ядра через цитоплазматическую мембрану и прозрачную оболочку. Вторым способом предполагал экстрагирование тем же инструментом ядродержащей области цитоплазмы (в 12 случаях –

с первым полярным тельцем). Преимуществ одного метода перед другим выявлено не было.

Отбор фибробластов 3–5-го пассажа производился посредством проточной цитометрии, а также по морфологическому критерию, основанному на данных А.С. Voquest (1999), в соответствии с которыми 95% клеток диаметром 10–15 мкм находятся в оптимальной для использования стадии клеточного цикла – в G<sub>1</sub> (или G<sub>0</sub>) периоде [9]. Нужно отметить, что экспериментальное обоснование зависимости диаметра и фазы клеточного цикла, которое учитывали авторы работы, было показано для фетальных фибробластов. Нормальный диплоидный набор хромосом фибробластов подтверждался цитогенетическим анализом. Интеграция системы «кариопласт-цитопласт» производилась посредством клеточного слияния.

Полученные путем SCNT клетки через 2–3 часа после слияния, а также овоциты II деления мейоза были подвергнуты партеногенетической активации. В первые 24 часа у 7 зигот, полученных посредством SCNT, наблюдались дегенерация и лизис, однако у 66% клеток через 6–7 часов после химической активации выявлялись процессы ремоделирования ДНК. На третий день из группы SCNT-овоцитов было получено 10 морул, состоящих из 5 и более клеток, а на пятый-шестой день определялось 5 бластоцист, количество бластомеров которых находилось в пределах 41–72. Столько же бластоцист исследователи получили партеногенетической активацией овоцитов II деления мейоза, но в их составе насчитывалось порядка 35–54 клеток.

Исходный клеточный материал и бластоцисты были подвергнуты генной дактилоскопии (анализ митохондриальной и ядерной ДНК) с целью установления соответствия последовательностей ДНК бластоцист и донорских клеток, а также выявления возможного «загрязнения» в процессе осуществления технических мероприятий. В двух случаях в каждой группе не удалось показать достоверных данных, касающихся происхождения бластоцист. В остальном, генотип зародышевой, полученных посредством SCNT, соответствовал генотипу донорских фибробластов и не включал фрагменты генетического материала овоцитов. Характерно, что вследствие клеточного слияния, наряду с внесением в цитопласт ядра от фибробласта, происходит передача и митохондриальной ДНК соматической клетки. В дальнейшем, по всей видимости, митохондрии, принадлежавшие овоциту замещаются новыми, а митохондриальная ДНК цитопласта подвергается вырождению.

Таким образом, А.Д. French с соавт. впервые воспроизвели начальные этапы клонирования человека с использованием метода SCNT. Показав идентичность генома полученных бластоцист и донорских клеток, исследователи не осуществляли детальный хромосомный анализ, нацеленный

на выявление возможных хромосомных aberrаций, не выявляли уровни экспрессии критических эмбриональных генов,

таких как Oct 4, Cdx2 и др., то есть не доказали, что клетки были полностью репрограммированы.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64–6.
2. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256–58.
3. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450 (7169): 497–502.
4. Stojkovic M., Stojkovic P., Leary C. et al. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2005; 11: 226–31.
5. Lu C., Lin G., Xie C. et al. Reconstruction of human embryos derived from

- somatic cells. *Chinese Science Bulletin* 2003; 48: 1840–3.
6. Campbell K.H. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1999; 1: 3–15.
7. Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–74.
8. French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer (SCNT) with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485–93.
9. Boquest A.C., Day B.N., Prather R.S. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 1013–19.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts Development of Human cloned Blastocysts Following Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) with Adult Fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485–93

## Получение мультипотентных клеток из GPR125<sup>+</sup> сперматогенных стволовых клеток

Сперматогенез является тонко регулируемым и сложным процессом, в который вовлечено несколько типов клеток. К ним относятся клетки, способные дифференцироваться в гаметы; гормон-секретирующие клетки Лейдига и клетки Сертоли, обеспечивающие регуляцию и дифференцировку клеток полового ряда. Первичные половые клетки, или гоноциты, имеют внегонадное происхождение. Они обособляются на задней стенке первичной кишки от прочих клеток формирующегося эмбриона и мигрируют в область зачатка половых желез на вентральной стороне мезонефроса. У эмбрионов мужского пола мигрирующие в гонады гоноциты делятся несколько раз. Тем самым они преобразуются в просперматогонии и создают некоторое число (определенный, но не окончательный пул) стволовых сперматогенных клеток. Затем сперматогенез приостанавливается на этом этапе и возобновляется уже при наступлении полового созревания, когда происходит дифференцировка стволовых клеток в сперматогонии типа А (темная цитоплазма). Они медленно делятся с образованием светлых быстроделющихся прогениторных клеток, дающих начало сперматогониям типа В. Последние, в свою очередь, вступают на путь дифференцировки в сперматоциты, а далее в сперматиды и сперматозоиды.

Культивирование сперматогенных стволовых/прогениторных клеток (СпСПК) до последнего времени являлось трудновыполнимой задачей, так как выделенные из протоков извитых семенных канальцев клетки даже на фидерном слое инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов быстро теряют пролиферативную активность [1]. Тем не менее, используя специфический коктейль факторов роста, в состав которого входили glial cell line-derived neurotrophic factor, EGF, bFGF и LIF, Т. Shinohara с соавт. (2003) удалось культивировать СпСПК мыши в течение длительного времени [2]. После пятимесячного культивирования трансплантация полученных клеток (germinal stem cells, GS-клетки) бесплодным мышам приводила к восстановлению сперматогенеза. Формирования тератом или каких-либо соматических тканей обнаружено не было, что свидетельствовало

о том, что GS-клетки надежно коммитированы в сперматогенном направлении.

Однако в более позднем исследовании Т. Shinohara с соавт. (2004) обнаружили, что после 4–7 недель культивирования GS-клеток, наряду с типичными колониями, выявляются колонии клеток, по своей морфологии сходные с ЭСК [3]. Более того, клетки ЭСК-подобных колоний удалось выделить и размножить при культивировании в среде, содержащей 15% сыворотки плодов коров и LIF, что является стандартным условием культивирования ЭСК. ЭСК-подобные клетки дифференцировались в разные типы соматических клеток при индукции *in vitro* и формировали тератомы при трансплантации иммунодефицитным мышам. Введение ЭСК-подобных клеток в полость бластоцисты приводило к образованию химерных эмбрионов. Наличие в семенниках неонатальных мышей клеток с мультипотентной природой позже было подтверждено немецкой исследовательской группой К. Guan и др. (2006). Полученные при культивировании СпСПК мыши мультипотентные клетки получили обозначение maGSCs (multipotent adult germline stem cells) [4]. Тем не менее, фенотипический профиль специфической субпопуляции сперматогенных клеток, которые могут при культивировании конвертироваться в ЭСК-подобные клетки, остается плохо изученным.

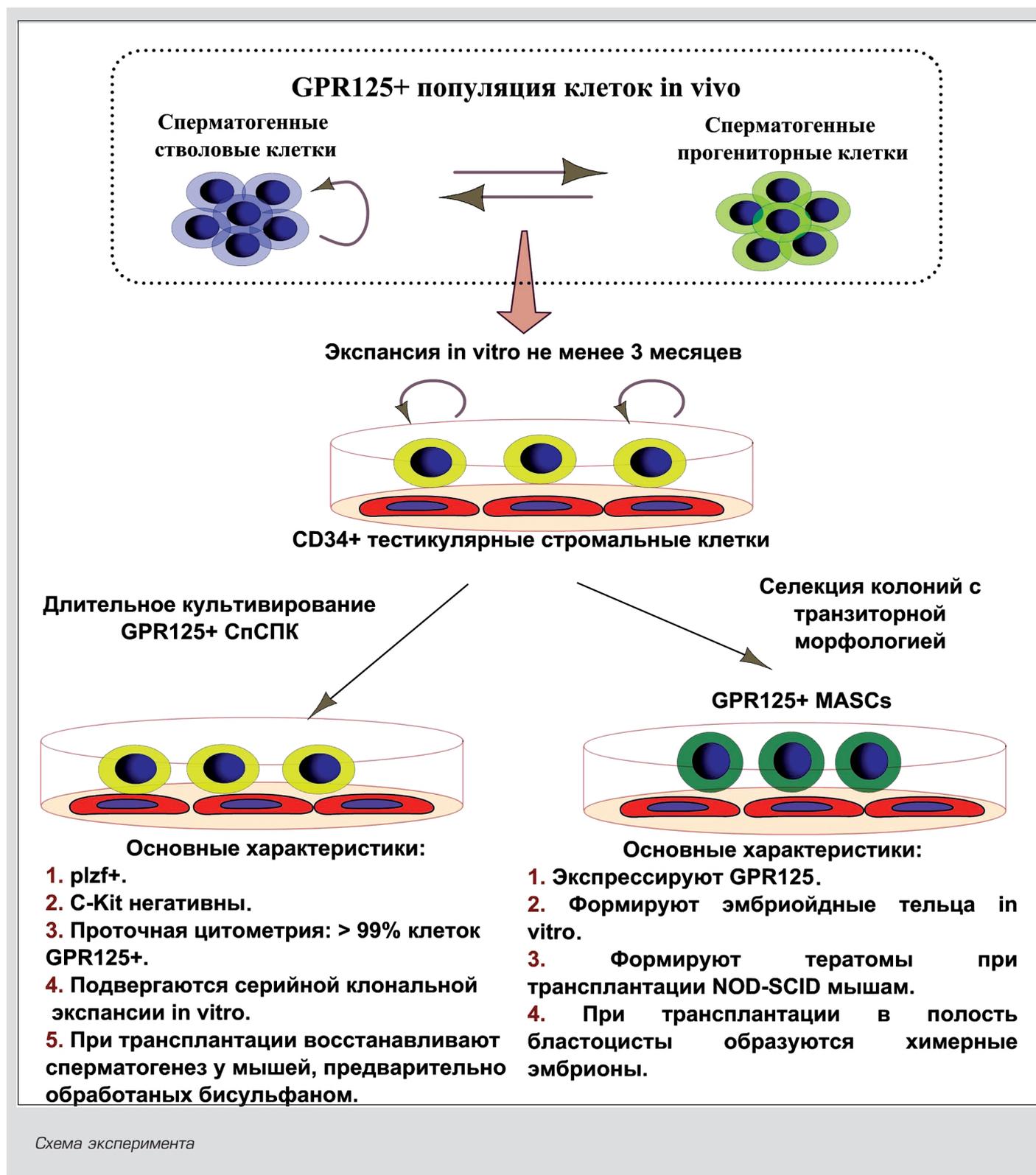
Ранее было показано, что поверхностный белок GPR125, экспрессирующийся в семенниках неонатальных мышей, является потенциальным маркером СпСПК [5]. Группа исследователей под руководством S. Rafii из Медицинского института Говарда Хьюза предположила, что GPR125<sup>+</sup> является маркером субпопуляции сперматогенных клеток, конвертирующихся в ЭСК-подобные клетки при длительном культивировании.

На первом этапе исследования, для визуализации экспрессии GPR125 генноинженерными методами были получены мыши, несущие ген LacZ, под контролем GPR125-промотора. Окрашивание срезов семенников на наличие галактозидазы показало, что экспрессия маркера обнаруживалась лишь в извитых семенных канальцах и ограничивалась

первым слоем клеток, непосредственно прилегающих к базальной мембране, то есть являвшихся сперматогониями.

Культивирование GPR125<sup>+</sup> клеток на обычном слое фидерных клеток оказалось неэффективно. Тогда авторы использовали фидерный слой из инактивированных тестикулярных стромальных клеток, содержащих CD34<sup>+</sup> перитубулярные клетки, которые, как ранее было показано, могут играть ключевую роль в экспансии сперматогенных клеток [6].

Культивирование сперматогенных клеток от Gpr125<sup>lacZ/lacZ</sup> мышей приводило к получению пролиферирующих колоний с экспоненциальной фазой роста. Клетки многократно пассировались и поддерживались в культуре вплоть до года без каких-либо признаков трансформации. На протяжении всего времени культивирования клетки поддерживали постоянный уровень экспрессии GPR125 и не экспрессировали поверхностный маркер c-kit (рис.).



Молекулярная идентичность GPR125<sup>+</sup> СпСПК после одновременного культивирования подтверждалась количественной ПЦР. СпСПК экспрессировали герминальные транскрипционные факторы Dazl, PLZF, Mvh и не экспрессировали транскрипционные факторы, характерные для более поздних стадий дифференцировки сперматогенных прогениторных клеток (Sox17, Tnp1, Adam2, Prm1 и Pcgk2). Эти данные свидетельствуют, что репопулирующие СпСПК имели герминальное происхождение и при этом находились в недифференцированном состоянии. Таким образом, авторы создали условия, которые позволили получить одновременно культуру GPR125<sup>+</sup> сперматогоний.

На следующем этапе эксперимента изучалась способность GFP<sup>+</sup> GPR125<sup>lacZ/lacZ</sup> СпСПК восстанавливать сперматогенез у обработанных бисульфитом C57Bl6 мышей. На 2–3-й месяц посттрансплантационного периода выявлялось большое количество GFP<sup>+</sup> Gpr125<sup>lacZ/lacZ</sup> колоний герминальных клеток внутри извитых семенных канальцев реципиентов. Клетки этих колоний характеризовались типичной сперматогенной морфологией. Окрашивание на наличие галактозидазы подтвердило, что небольшая субпопуляция GPR125<sup>+</sup> (LacZ<sup>+</sup>) клеток среди общей массы GFP<sup>+</sup> клеток непосредственно контактировала с базальной мембраной.

Как и в исследовании T. Shinohara et al. (2004), после трех месяцев культивирования СпСПК наряду с типичными колониями наблюдалось появление ЭСК-подобных колоний клеток, обозначенных авторами как MACSs (multipotent adult spermatogonial-derived stem cells). MACSs имели более высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение и успешно пролиферировали в среде для культивирования мышинных ЭСК. Абсолютное большинство MACSs после длительного культивирования имели нормальный кариотип без каких-либо цитогенетических аномалий и экспрессировали высокие уровни GPR125 и Oct4.

Потенции Gpr125<sup>lacZ/lacZ</sup> MACSs на первом этапе оценивались путем формирования и дифференцировки эмбрионидных теллец *in vitro* [7]. В течение 7 дней после посева в

формирующихся эмбрионидных тельцах выявлялись разные уровни экспрессии GPR125 с четкими границами между GPR125<sup>+</sup> и GPR125<sup>-</sup> областями. Полностью сформированные колонии содержали HNF3b<sup>+</sup> (FOXA2<sup>+</sup>) клетки, являющиеся производными энто- или эктодермы, цитокератин-позитивные или GFAP<sup>+</sup> клетки, являющиеся производными эктодермы, и клетки, экспрессирующие миозин скелетных мышц и являющиеся производными мезодермы.

Подкожная трансплантация GPR125<sup>lacZ/lacZ</sup> MACSs иммунодефицитным мышам приводила к формированию тератом (в 14 из 14 случаев). Гистологический и иммуногистохимический анализ тератом показал наличие производных всех трех зародышевых листков. Введение GPR125<sup>lacZ/lacZ</sup> MACSs в полость бластоцист приводило к формированию химерных эмбрионов с эффективностью 22% (8 эмбрионов из 37 бластоцист).

Анализ экспрессии транскрипционных факторов GPR125<sup>lacZ/lacZ</sup> MACSs в сравнении с ЭСК, СпСПК и мышинными эмбриональными фибробластами показал высокий уровень экспрессии Oct4, Nanog и Sox2 в MACSs и ЭСК. Минимальная экспрессия типичных маркеров сперматогенных стволовых клеток, Plzf, Ret и Stra8, наблюдалась у MACSs, тогда как высокая степень экспрессии этих факторов, как и ожидалось, обнаруживалась у СпСПК. Удивительно, что некоторые герминально-ассоциированные факторы транскрипции (например, Dazl) практически не экспрессировались в MACSs, как и некоторые типичные факторы транскрипции ЭСК (Gdf3, Esg1, Rex1). Различия в экспрессии этих генов свидетельствуют, что MACSs являются отдельным типом стволовых клеток.

Таким образом, авторы исследования охарактеризовали GPR125 как поверхностный клеточный маркер, характеризующий популяцию самообновляющихся c-kit<sup>+</sup> PLZF<sup>+</sup> СпСПК, которые способны восстанавливать сперматогенез при трансплантации мышам и конвертироваться в GPR125<sup>+</sup> MACSs при длительном культивировании. Полученные данные позволяют утверждать, что GPR125<sup>+</sup> сперматогенные клетки являются клетками-предшественниками MACSs.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Nagano M., Ryu B.Y., Brinster C.J. et al. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod.* 2003; 68: 2207–14.
2. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K. et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 612–16.
3. Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J. et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119: 1001–12.
4. Guan K., Nayernia K., Maier L.S. et al. Pluripotency of spermatogonial stem

cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440: 1199–203.

5. Valenzuela D.M., Murphy A.J., Frenthewey D. et al. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nature Biotechnol.* 2003; 21: 652–9.

6. Kuroda N., Nakayama H., Miyazaki E. et al. Distribution and role of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in human normal testicular stroma. *Histol. Histopathol.* 2004; 19: 743–51.

7. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005; 19: 1129–55.

Подготовили: С.А. Сергеев, Ю.Б. Дьякова

По материалам: Seande M., James D., Shmelkov S. et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125<sup>+</sup> germline progenitors. *Nature* 2007; 449: 346–52

## Эндотелиальные клетки–предшественницы костного мозга играют ключевую роль в прогрессии опухолевого роста на примере модели легочных метастазов у мышей

Наиболее ранней стадией рака является карцинома *in situ*. Она представляет собой образования мелкого размера, чаще всего не более 1–3 мм в диаметре, не прорастающие глубже базальной мембраны. В этой фазе опухоли лишены сосудов и питание клеток осуществляется лишь за счет процесса диффузии необходимых веществ из окружающих тканей. Так как трансформированные клетки значительно лимитированы в отношении необходимых для жизнедеятельности продуктов, рост новообразований в эту фазу сильно замедлен и они в течение нескольких месяцев или даже лет пребывают в «латентном состоянии». Ключевые события, которые инициируют фазу быстрого (экспоненциального) роста опухоли, плохо изучены. Они четко ассоциируются с васкуляризацией новообразования, так называемым «ангиогенным переключением», которое, возможно, стимулируется ангиогенными факторами продуцируемыми трансформированными клетками [1].

Формирование метастазов во многих случаях происходит по схожему сценарию. Большинство попадающих в системную циркуляцию малигнизированных клеток, по-видимому, погибает, а меньшая часть заселяет преме́тастатические ниши или участвует в их формировании [2, 3]. Затем клетки пролиферируют и формируют лишенные сосудов микрометастазы диаметром до 1–2 мм, в которых появление новых клеток находится в равновесии с их гибелью [4]. В подобном состоянии микрометастазы могут находиться длительное время, их прогрессия в макрометастазы также ассоциируется с «ангиогенным переключением» [5].

Неудивительно, что феномен «ангиогенного переключения» является предметом внимательного изучения, так как раскрытие основных механизмов данного процесса может дать толчок к разработке новых видов терапии и профилактики новообразований. Новые кровеносные сосуды могут образовываться путем ответвления от уже существующих или формироваться *de novo* за счет дифференцировки эндотелиальных клеток–предшественниц, мигрирующих из костного мозга [1]. Ранее было продемонстрировано, что циркулирующие эндотелиальные клетки–предшественницы могут участвовать в формировании сосудистой сети некоторых видов опухолей, а также трансплантированных тканей [6, 7]. Однако количество мигрирующих клеток было столь мало, что какая-либо существенная роль у описанного явления остается сомнительной.

Эти данные, опубликованные в журнале *Science* исследовательской группой V. Mittal, позволяют по новому оценить роль циркулирующих эндотелиальных клеток–предшественниц костномозгового происхождения в процессе «ангиогенного переключения».

На первом этапе исследования RPF<sup>+</sup> клетки карциномы легких Левиса, трансплантировали внутрикожно сингенным мышам, клетки костного мозга которых экспрессировали GFP (рис. 1А). На 14–е сут. после введения злокачественных клеток первичные опухоли подвергались резекции. Легкие исследовались на наличие метастазов на 14–е, 21–е и 28–е сут. Через 2 недели в легочной ткани животных было обнаружено в среднем около 12 RPF<sup>+</sup> микрометастазов (менее 1 мм в диаметре). Общее количество метастазов увеличивалось со временем (22 и 35 к 21–м и 28–м сут., соответственно). На 28–е сут. посттрансплантационного периода

47% процентов метастазов являлись макрометастазами (более 1 мм в диаметре). Таким образом, прогрессия микрометастазов в макрометастазы наступала на 3–4–й неделе после введения малигнизированных клеток.

Ассоциируется ли прогрессия микрометастазов в макрометастазы с «ангиогенным переключением»? Иммуногистохимическое исследование метастазов на 14–е сут. показало практически полное отсутствие капиллярной сети при наличии редких CD31<sup>+</sup> эндотелиоцитов. Напротив, анализ макрометастазов на 21–28–е сут. посттрансплантационного периода выявил большое количество сосудов, содержащих CD31<sup>+</sup> клетки. Следовательно, экспансия роста метастазов сопровождалась и параллельным развитием и ростом сосудов.

При детальном анализе макрометастазов было обнаружено, что около 13% клеток эндотелия формирующихся сосудов характеризовались фенотипом GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, то есть имели костномозговое происхождение. Как было показано ранее, эндотелиальные клетки костномозгового происхождения являются потомками костномозговых эндотелиальных клеток–предшественников (bone-marrow endothelial progenitor cells, BM-EPCs) с высокой степенью экспрессии VE-cadherin, VEGFR2, слабой экспрессией CD31 и CD133 и отсутствием экспрессии гематопозитических маркеров [8]. Инфильтрация GFP<sup>+</sup>/VE-cadherin<sup>+</sup> BM-EPCs наблюдалась по периферии микрометастазов. Концентрация этой популяции клеток была в 5 раз выше, чем в нормальной окружающей легочной ткани.

Таким образом, прогрессия микрометастазов в макрометастазы ассоциируются с «ангиогенным переключением», в процессе которого BM-EPCs мигрируют в очаги поражения, дифференцируются и участвуют в формировании сети кровеносных сосудов метастатических очагов.

Для оценки значимости мигрирующих эндотелиальных клеток–предшественников в прогрессии роста метастазов была создана *in vivo* модель с селективной недостаточностью BM-EPCs. Авторы сфокусировались на транскрипционном факторе Id1, так как у мышей с нокаутом по гену Id1 наблюдается ослабленный рост новообразований по причине дефектов формирования сосудов [9]. В ответ на введение клеток опухоли авторы обнаружили 2,5–кратное возрастание экспрессии мРНК Id1 в клетках костного мозга. Более того, экспрессия ограничивалась популяцией EPCs и не была обнаружена в других клетках костного мозга, что может свидетельствовать о ключевой роли Id1 в реализации функций EPCs по формированию сосудистой сети новообразований.

В модели использовалась shRNA, которая снижала уровень эндогенного Id1, а также его мРНК, более чем на 95%. В качестве контроля использовалась неспецифическая shRNA. Lin<sup>–</sup> клетки костного мозга Rosa26–rtTA трансгенных мышей трансфицировались вектором на основе лентивируса с Id1 или неспецифической shRNA, экспрессия которых могла быть индуцирована доксициклином. Этот подход позволил авторам селективно подавлять экспрессию Id1 в клетках костного мозга в ранее установленное время прогрессии микрометастазов в макрометастазы, не оказывая какого-либо влияния на вклад BM-EPCs в рост первичной опухоли, которая не растет у мышей с нокаутом по гену Id1.

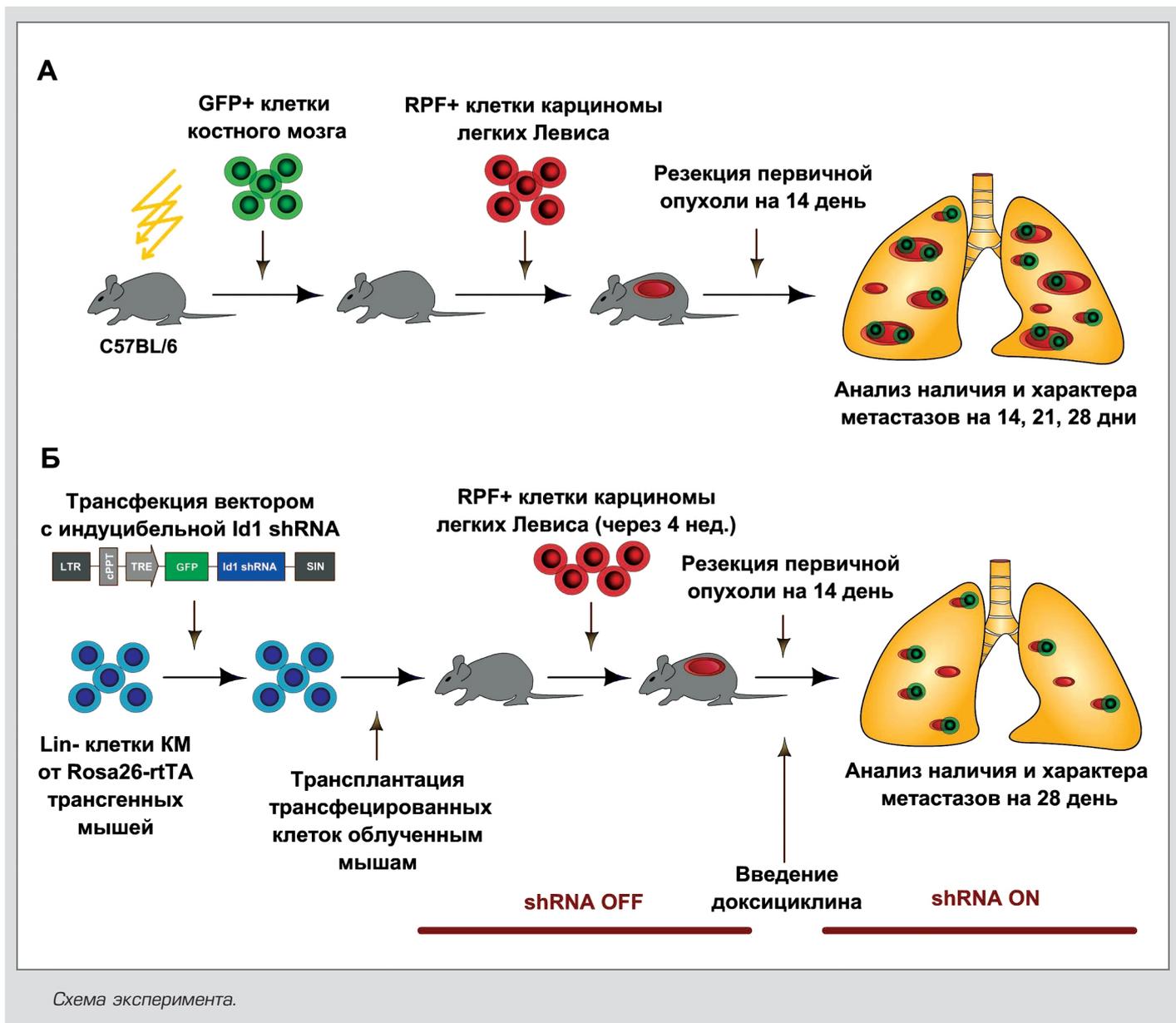


Схема эксперимента.

Трансфицированные клетки трансплантировались латентно облученным мышам. На 4-й неделе посттрансплантационного периода осуществлялась подкожная инъекция RPF+ клеток карциномы легких Левиса. До введения доксициклина параметры роста опухолей у мышей обеих групп были одинаковы. Однако введение доксициклина на 14-е сут. после трансплантации опухолевых клеток приводило к существенному снижению общего количества легочных метастазов у животных опытной группы к 28-м сут. ( $28 \pm 5$  у мышей без введения доксициклина (-Dox) и  $8 \pm 5$  у мышей с введением доксициклина (+Dox) в сравнении с животными контрольной группы ( $32 \pm 7$  у -Dox мышей и  $33 \pm 6$  у +Dox мышей). Снижение количества метастазов у +Dox мышей опытной группы было обусловлено снижением количества макрометастазов ( $13,8 \pm 6,1$  у -Dox мышей и  $0,6 \pm 1,3$  у +Dox мышей,  $P = 0,0014$ ). Не было обнаружено значительного снижения числа микрометастазов у всех групп мышей, что свидетельствует о том, что репрессия Id1 не влияет на начальную колонизацию опухолевыми клетками тканей легких, однако нарушает прогрессию микрометастазов в макрометастазы. Более того, +Dox мыши

опытной группы имели значительно большую продолжительность жизни.

Подавление экспрессии Id1 приводило к трехкратному снижению уровня циркулирующих c-kit<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup> EPCs в сравнении с -Dox мышами. Снижение количества EPCs было специфично, так как уровни клеток гематопозитического ряда, включая B-, T-клетки, миелоидные и VEGFR1<sup>+</sup> клетки, существенно не изменялись. Индуцированная недостаточность циркулирующих BM-EPCs привела к существенному снижению плотности сосудов в метастатических очагах у +Dox мышей опытной группы ( $22,2 \pm 4,7\%$  у -Dox мышей и  $4,1 \pm 2,9\%$  у +Dox мышей).

Таким образом, BM-EPCs играют ключевую роль в процессе «ангиогенного переключения», который лежит в основе прогрессии метастатических очагов. При этом BM-EPCs не влияют на инициацию образования метастазов, которая, как было показано ранее, зависит от VEGFR1<sup>+</sup> гемопоэтических клеток [2]. Несмотря на то, что лишь около 12% эндотелиальных клеток в сосудистой сети макрометастазов имеют костномозговое происхождение, недостаточность мигрирующих EPCs приводит к критическому

снижению ангиогенеза и, как следствие, подавлению формирования макрометастазов. Эти факты свидетельствуют о том, BM-EPSCs могут иметь важную «инструктивную» функ-

цию в инициации формирования новых сосудов благодаря секреции многочисленных паракринных факторов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bergers G., Benjamin L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 401–10.
2. Kaplan R., Riba R., Zacharoulis S. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820–7.
3. Hiratsuka S., Watanabe A., Aburatani H., Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell. Biol.* 2006; 8: 1369–75.
4. Townson J., Chambers A. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle* 2006; 5: 1744–50.
5. Holmgren L., O'Reilly M., Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.

*Nat. Med.* 1995; 1: 149–53.

6. Peters B., Diaz L., Polyak K. et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat. Med.* 2005; 11: 261–2.

7. Minami E., Laflamme M., Saffitz J., Murry C. Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart. *Circulation* 2005; 112: 2951–8.

8. Nolan D., Ciarrocchi A., Mellick A. et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 2007; 21: 1546–58.

9. Ruzinova M., Schoer R., Gerald W. et al. Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell* 2003; 4: 277–89.

Подготовил В.С. Сергеев

По материалам: Gao D., Nolan D., Mellick A. et al. *Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. Science.* 2008; 319: 195–8

## Количество стволовых гемопоэтических клеток в кровотоке подвержено суточным колебаниям

Одним из наиболее эффективных методов лечения пациентов с заболеваниями системы крови (иммунопатии, лейкозы, лимфомы) является трансплантация клеток костного мозга [1, 2]. Эффективность операции определяется не только HLA-совместимостью клеточного материала, но и успешностью проведения предоперационных мероприятий – миелоабляции. Помимо ликвидации трансформированных клеток крови и освобождения костномозговых ниш от стволовых кроветворных клеток (СКК) реципиента радикальные способы предоперационной подготовки сопровождаются тяжелыми побочными эффектами в виде манифестации оппортунистических инфекций, остеопении, поражения эндокринных желез, печени, нервной и дыхательной систем [3].

С целью предотвращения побочных эффектов разрабатываются новые щадящие способы предтрансплантационных мероприятий. В частности, положительные результаты были получены при системном введении антител против c-kit (CD 117), экспрессирующегося СКК. В результате блокировались c-kit-зависимые процессы пролиферации, дифференцировки, миграции и адгезии клеток, что вызывало временное высвобождение недифференцированных гемопоэтических клеток из занимаемых костномозговых ниш, нивелируя риск развития опасных побочных реакций [4]. Одновременно детализируются физиологические механизмы миграции недифференцированных гемопоэтических клеток, что создает предпосылки для разработки более совершенных предтрансплантационных методов [5].

В журнале *Nature* S. Mendez-Ferrer с соавт. опубликовали материалы исследования, в которых описали суточные колебания численности СКК в крови и идентифицировали механизмы высвобождения недифференцированных гемопоэтических клеток из костномозговых ниш.

Авторы показали, что максимальное содержание СКК в крови мышей приходится на 5 часов после начала воздействия светового стимула длительностью 12 часов, а самая низкая численность наблюдается через 5 часов

после прекращения его действия. Приняв выявленные циркадианные колебания за стандарт, исследователи показали, что при воздействии только светом в течение 2 недель происходит нарушение ритмичности изменения содержания СКК в крови, а при нахождении животных в темноте на протяжении 2 недель колебания численности имели ритмичный характер, который отличается от стандартного. Следовательно, изменение длительности светового раздражителя влияет на численность СКК в кровотоке.

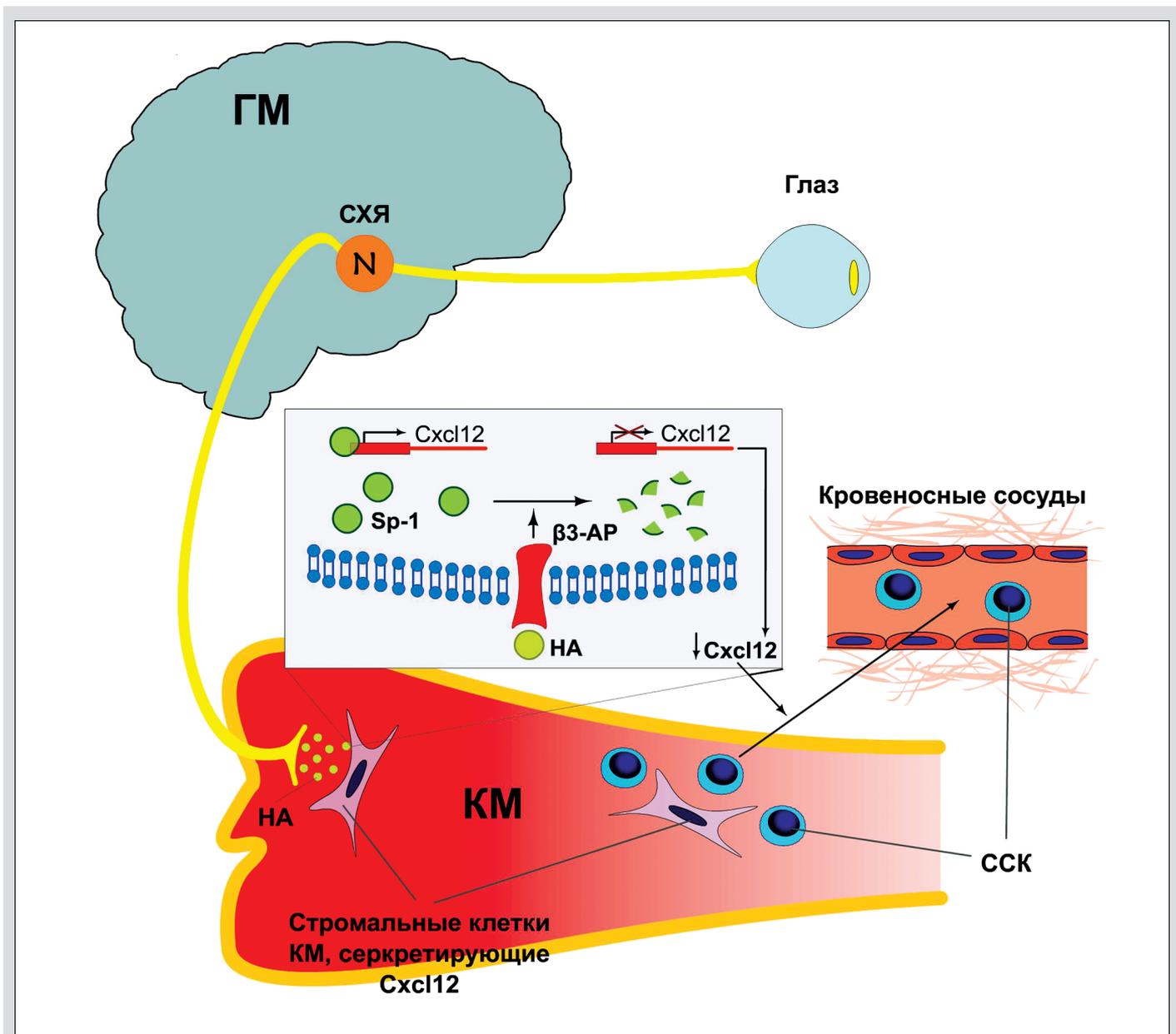
Одним из основных цитокинов, ответственных за миграцию недифференцированных гемопоэтических клеток, является CXCL12 (SDF-1) [6, 7]. Механизм действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), применяющегося в клинической практике для мобилизации СКК в кровоток, реализуется, как считается, через индукцию биодegradации CXCL12 и супрессию синтетической активности остеобластов [8]. Исследователи установили, что протеолизу подвергается лишь та фракция цитокина, которая синтезируется остеобластами, а циркадианным колебаниям подвержен уровень экспрессии мРНК CXCL12 в преостеобластах и ретикулярных клетках.

По аналогии с доказанной зависимостью секреции Г-КСФ от сигналов симпатической нервной системы (СНС) [9] авторы предположили, что продукция CXCL12 также регулируется симпатическим отделом вегетативной нервной системы. Подтверждением послужило отклонение суточного ритма экспрессии CXCL12 при денервации костного мозга как введением 6-гидроксидофамина (системная обратимая дисфункция СНС), так и односторонней резекцией бедренного и седалищного нервов вблизи выхода их из поясничного и крестцового сплетений соответственно. Десимпатизацию костного мозга подтверждали использованием антител против тирозинкиназы, что позволяет визуализировать волокна СНС при нормальном физиологическом состоянии [10]. Аритмичность колебаний секреции CXCL12 коррелировала с отклонением содержания СКК в кровотоке.

Для идентификации типа адreno-рецепторов, посредством которых реализуется влияние ЦНС на функционирование элементов костномозгового микроокружения, исследователи применяли селективные и неселективные адrenomиметики и антагонисты. Было показано, что секреция CXCL12 изменяется лишь при воздействии на  $\beta 3$ -адreno-рецепторы ( $\beta 3$ -ар), которые экспрессируются преостеобластами и фибробластоподобными ретикулярными клетками, определяя незначительную роль зрелых остеобластов, содержащих  $\beta 2$ -ар в регуляции циркадианных колебаний уровня СКК в кровотоке. При стимуляции  $\beta 3$ -ар снижалась продукция транскрипционного фактора Sp-1 в связи с ингибированием цАМФ-зависимой протеинкиназы, снижалась экспрессия мРНК CXCL12, что ассоциировалось с повышением уровня недифференцированных гемопоэтических клеток в крови. Сходная тенденция наблюдалась при блокаде цАМФ-зависимой протеинкиназы специфическим ингибитором (H-89).

Напротив, блок  $\beta 3$ -ар за час до инициации действия светового раздражителя предотвращал утреннее повышение содержания СКК в кровотоке, а применение  $\beta$ -адrenomиметиков не влияло на колебание уровня недифференцированных гемопоэтических клеток мышей, лишенных гена *Adrb3*, кодирующего  $\beta 3$ -ар.

Авторы показали определяющую роль основных генов «биологических часов» *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* и *Rev-erba* [11], активно экспрессирующихся как нейронами супрахиазмального ядра гипоталамуса, связанными с сетчаткой ретиногипоталамическими трактами, так и в периферических тканях. Однако основное значение в регуляции циркадианных колебаний численности СКК в кровотоке принадлежит именно структурам ЦНС, так как исследователи *in vitro* показали, что даже при отсутствии *Bmal1*, *Per1* или *Per2* в генотипе стромальных клеток при воздействии неселективного  $\beta$ -адrenomиметика наблюдалось закономерное снижение экспрессии CXCL12.



Модель регуляции миграции СКК:

ГМ – головной мозг; СХЯ – супрахиазмальное ядро; КМ – костный мозг;  $\beta 3$ -АР –  $\beta 3$ -адreno-рецептор, НА – норадреналин

Нейроны супрахиазмального ядра имеют рецепторы к мелатонину – основному гормону эпифиза, регулирующему биоритмы организма [12]. Секретция гормона также подчинена циркадианным колебаниям с максимумом концентрации в крови в ночное время суток [13]. В этой связи, сбалансированная модуляция активности симпатической нервной системы мелатонином через клетки супрахиазмального ядра, контролирующаяся основными генами «биологических часов», определяет ритмичность выделения катехоламинов в костном мозге. В итоге обеспечивается физиологическая циркуляция СКК между костномозговыми нишами и периферическим кровотоком.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Buckley R., Schiff S., Schiff R. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 508–16.
2. Appelbaum F., Herzig G., Ziegler J. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978; 52: 85–95.
3. Wingard J.R., Vogelsang G.B. Deeg H.J. Stem Cell Transplantation: Supportive Care and Long-Term Complications. *Hematology* 2002; 422–44.
4. Czechowicz A., Kraft D., Weissman I. Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science* 2007; 318: 1296–99.
5. Mendez-Ferrer S., Lucas D., Battista M. et al. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008; 452: 442–7.
6. Aiuti A., Webb I.J., Bleul C. et al. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD341 hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD341 progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 111–20.

Таким образом, содержание недифференцированных гемопоэтических клеток в системном кровотоке регулируется в том числе и генами «биологических часов», ритмично индуцирующими секрецию катехоламинов синаптическими окончаниями СНС в костном мозге в корреляции с действием светового раздражителя и функционированием эпифиза (рис.). Данная закономерность может быть использована в выборе времени трансплантации недифференцированных гемопоэтических клеток – при максимальной концентрации СКК в кровотоке, а также в мобилизации СКК из костномозговых ниш путем воздействия на определенные звенья регуляции миграции СКК.

7. Wright D.E., Bowman E. P., Wagers A. J. et al. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 1145–54.
8. Levesque J. P., Hendy J., Takamatsu Y. et al. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 187–96.
9. Katayama Y., Battista M., Kao W.M. et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem and progenitor cell egress from bone marrow. *Cell* 2006; 124: 407–21.
10. Price J. An immunohistochemical and quantitative examination of dorsal root ganglion neuronal subpopulations. *J. Neurosci.* 1985; 5(8): 2051–9.
11. Levi F., Schibler U. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 47: 593–628.
12. Korf H.W., von Gall C. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006; 252: 57–68.
13. Pelham R.W. A serum melatonin rhythm in chickens and its abolition by pinealectomy. *Endocrinology* 1975; 96 (2): 543–6.

*Подготовил И.Я. Бозо*  
*По материалам Mendez-Ferrer S., Lucas D., Battista M. et al. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. Nature 2008; 452: 442–7*

## Определение иерархии среди мультипотентных гемопоэтических клеток человека

Мультипотентность и способность к долговременному самообновлению являются главными качествами гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Следующей ступенью в иерархии гемопоэтических клеток являются мультипотентные клетки-предшественницы (МПП), которые сохраняют множественный дифференцировочный потенциал, но утрачивают способность к долговременному самообновлению. Иммунофенотипические характеристики, определяющие иерархию среди этих популяций клеток человека, пока еще не были четко определены.

Ранее было показано, что фракции клеток костного мозга и пуповинной крови человека, содержащие ГСК, обогащены Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup> клетками [1, 2]. R. Majeti и соавт. предложили использовать в качестве дополнительного маркера антиген CD45RA, с помощью которого удалось продемонстрировать, что Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> фракция клеток костного мозга и пуповинной крови человека могут быть разделены на три субпопуляции: CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>, CD90<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> и CD90<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> клетки.

Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клеточные субпопуляции были выделены из образцов пуповинной крови человека с помощью FACS, с чистотой >95%. Методом колониеобразующего теста в среде Methocult, авторы оценили дифференцировочный

потенциал всех трех субпопуляций. CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> и CD90<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> клетки формировали все типы миелоидных колоний. Из 180 CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> клеток всего 6 образовали колонии, что свидетельствует об ограниченном дифференцировочном потенциале этой популяции. Для оценки способности к пролиферации, одиночные клетки (n=20) из каждой популяции помещались в среду без сыворотки, с добавлением Flt-3, SCF, TPO, IL-3, IL-6 и культивировались в течении 2-х недель, после чего подсчитывалось количество жизнеспособных клеток. CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> клетки интенсивно пролиферировали (среднее количество образовавшихся клеток – 345000), CD90<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> клетки пролиферировали с меньшей скоростью (среднее количество образовавшихся клеток – 67500), и CD90<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> клетки пролиферировали очень слабо с образованием всего нескольких живых клеток. Эти результаты позволяют предполагать, что CD90<sup>-</sup> субпопуляции клеток являются менее примитивными, по сравнению с CD90<sup>+</sup> субпопуляциями.

Клетки каждой из популяций помещались в среду без сыворотки, с добавлением цитокинов и после 4-х дней культивирования анализировались на экспрессию CD90 и CD45RA. CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> клеточная популяция давала

начало всем трем субпопуляциям,  $CD90^-CD45RA^-$  клеточная популяция дифференцировалась в  $CD90^-CD45RA^+$ , а  $CD90^-CD45RA^+$  клетки давали начало только себе подобным. В совокупности эти данные устанавливают иерархию клеток *in vitro*, в которой  $CD90^+CD45RA^-$  клетки дают начало  $CD90^-CD45RA^-$  клеткам, а те в свою очередь дают начало  $CD90^-CD45RA^+$  клеткам.

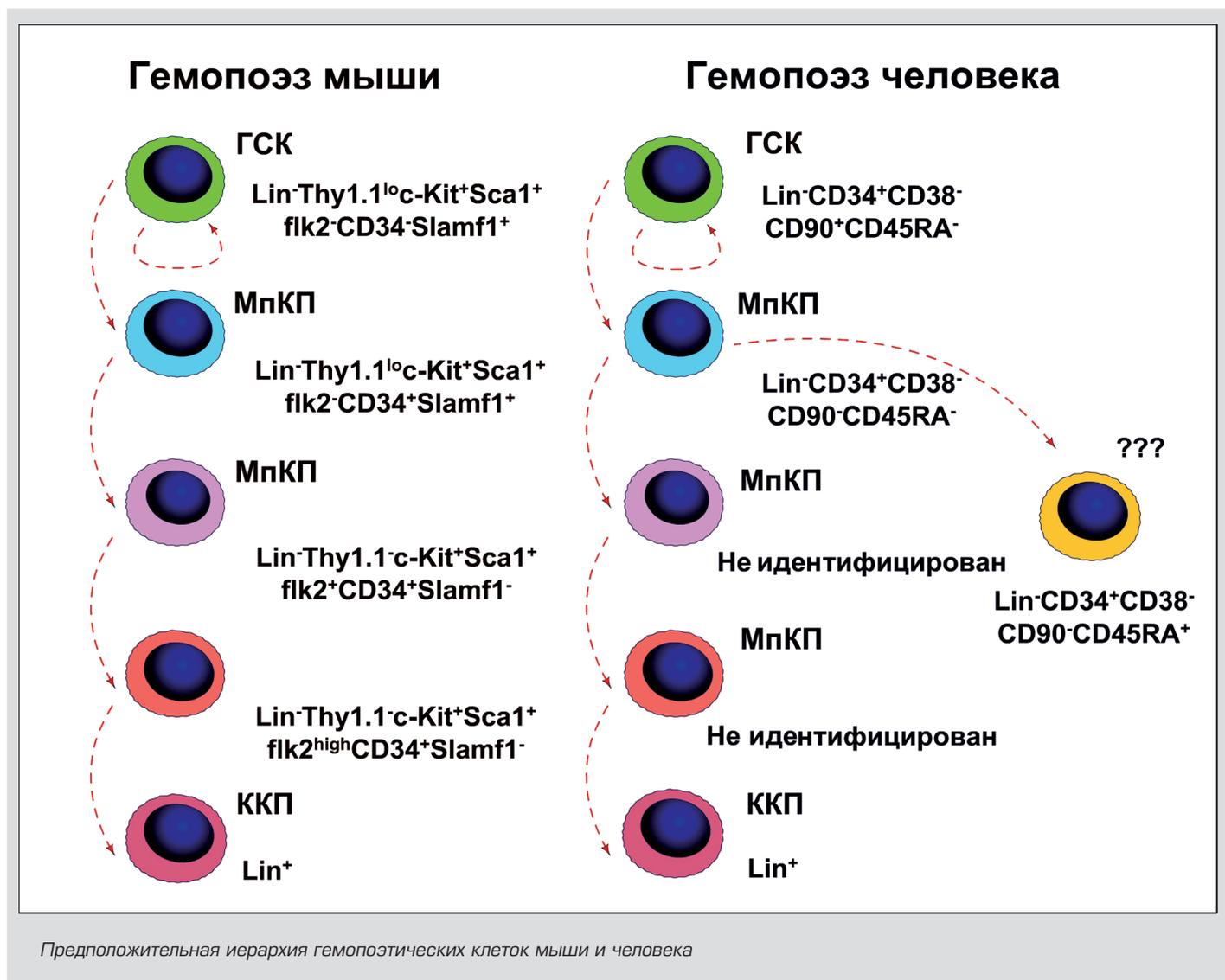
Для экспериментов по трансплантации клеток *in vivo* авторы статьи использовали новорожденных мышей линии NOD/SCID/IL-2Rg null (NOG), предварительно подвергнув их облучению в сублетальных дозах. Трансплантация как  $CD90^+CD45RA^-$ , так и  $CD90^-CD45RA^-$  клеток приводила к тому, что через 12 недель в периферической крови, костном мозге и селезенке мышей отмечались  $CD45^+$  человеческие миелоидные и В-лимфоидные клетки. В пересчете на 100 трансплантированных клеток, у животных, которым были пересажены  $CD90^+CD45RA^-$  клетки наблюдался в несколько раз более высокий уровень химеризма (в 7–9 раз) и обнаруживалось больше человеческих миелоидных клеток (также в 7–9 раз), чем у мышей, которым были пересажены  $CD90^-CD45RA^-$  клетки.

При трансплантации  $CD90^+CD45RA^+$  клеток в периферической крови, костном мозге и селезенке животных не

отмечалось человеческих клеток даже на сроке 4–х недель после трансплантации.

Для установления иерархических взаимоотношений между исследуемыми популяциями *in vivo*, анализировали иммунофенотип человеческих  $Lin^-CD34^+CD38^-$  клеток в костном мозге привитых мышей. Все три субпопуляции были обнаружены у мышей привитых  $CD90^+CD45RA^-$  клетками, только две  $CD90^-$  субпопуляции обнаруживались у мышей привитых  $CD90^-CD45RA^-$  клетками. Таким образом, среди  $Lin^-CD34^+CD38^-$  клеток можно установить дифференцировочную иерархию *in vivo*, на верхней ступени которой находятся  $CD90^+CD45RA^-$  клетки, далее следуют  $CD90^-CD45RA^-$  клетки, и наконец,  $CD90^-CD45RA^+$  клетки (рис.).

Способность к долговременному самообновлению является ключевой характеристикой отличающей ГСК от МПП и определяется как способность к вторичной трансплантации. Исследователи протестировали способность  $CD90^+CD45RA^-$  и  $CD90^-CD45RA^-$  клеток к трансплантации вторичным реципиентам. Человеческие  $CD45^+$  клетки были отмечены у 100% (12 из 12) мышей, которым были пересажены клетки от  $CD90^+$  первичных реципиентов и только у 37,5% (3 из 8) мышей, которым были пересажены клетки от  $CD90^-$  первичных реципиентов.



R. Majeti и соавт. продемонстрировали, что популяция CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> клеток пуповинной крови является мультипотентной, обладает ограниченной способностью к самообновлению и в гематопозитической иерархии находится на ступень ниже CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> клеточной популяции. По мнению авторов, CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> клетки представляют фракцию мультипотентных клеток-предшественниц в гемопоэзе человека.

В данном исследовании впервые был применен подход с использованием набора маркеров Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> и новорожденных NOG мышей, что позволило выделить фракцию клеток с ГСК активностью в гораздо меньшем числе клеток, чем в предыдущих работах.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kondo M., Wagers A., Manz M. et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21: 759–806.
2. Ishikawa F., Yasukawa M., Lyons B. et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 2005; 106: 1565–73.

Выделение новой фракции мультипотентных клеток предшественников может иметь большое значение для изучения и терапии острого миелобластного лейкоза. В серии экспериментов по ксенотрансплантации было показано, что стволовые клетки лейкоза (СКЛ) локализованы в Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup> фракции лейкозных клеток [3, 4]. Исследователи предполагают, что выделенная в данной работе фракция мультипотентных клеток-предшественников является теми самыми клетками, которые могут давать начало СКЛ. R. Majeti и соавт. надеются выявить генетические или эпигенетические изменения, которые ведут к трансформации МПП в способные к долговременному самообновлению СКЛ.

3. Blair A., Hogge D., Ailles E., Lansdorp P., Sutherland H. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 1997; 89: 3104–12.
4. Miyamoto T., Weissman I., Akashi K. AML1/ETO expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 7521–6.

Подготовила А.Д. Краснодембская

По материалам: Majeti R, Park C., Weissman I. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 635–45

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

### Эффективность дендритноклеточных вакцин на основе дендритных клеток I типа: результаты клинических исследований

Противоопухолевая вакциноterapia – это лечебный и профилактический метод активной специфической иммунотерапии, основанный на использовании опухолевых антигенов как с адьювантом, так и без него для усиления противоопухолевого иммунного ответа. Особенностью действия противоопухолевых вакцин является индукция иммунного ответа, направленного на элиминацию иммунорезистентных опухолевых клеток. Противоопухолевый эффект достигается повторным введением антигенного материала в режиме вакцинотерапии [1].

Несмотря на то, что применение вакцин в терапии онкологических заболеваний в настоящий момент находится на стадии клинических испытаний, этот подход считается весьма перспективным. Дендритные клетки (ДК), как ключевое звено регуляции иммунных реакций, опосредованных Т-лимфоцитами [2], привлекают большой интерес в качестве возможных адьювантов для иммунной терапии различных заболеваний. В настоящее время результаты клинических исследований дендритноклеточных вакцин в терапии неоплазий были получены несколькими независимыми клиническими центрами. В большинстве проведенных тестов *in vivo* и *in vitro* было показано, что подобные вакцины стимулируют развитие

противоопухолевого иммунного ответа и не имеют тяжелых побочных эффектов [1, 3–5]. Однако до настоящего времени исследования были направлены на определение переносимости и токсичности вакцин, но не их эффективности.

Важным вопросом в разработке дендритноклеточных вакцин является вопрос о том, какие именно дендритные клетки следует использовать в качестве основы вакцины, а именно: зрелые или незрелые ДК. Использование зрелых ДК, как предполагают некоторые исследователи [6], более предпочтительно, так как они с меньшей вероятностью способны вызывать состояние толерантности к антигену. Незрелые дендритные клетки присутствуют в тканях организма, постоянно фагоцитируя антигены, находящиеся во внеклеточном матриксе [7, 8]. Связывание бактериальных продуктов с паттерн-распознающими рецепторами ДК [9], связывание рецептора CD40 на мембране ДК с его лигандом CD154 [10] на мембране Т-лимфоцита и IFN-γ [11] запускают процесс созревания дендритных клеток. В зависимости от природы антигена и, соответственно, от пути стимуляции незрелые ДК дифференцируются в ДК первого либо второго типа (ДК1 и ДК2 соответственно), которые мигрируют в регионарные лимфатические узлы [12].

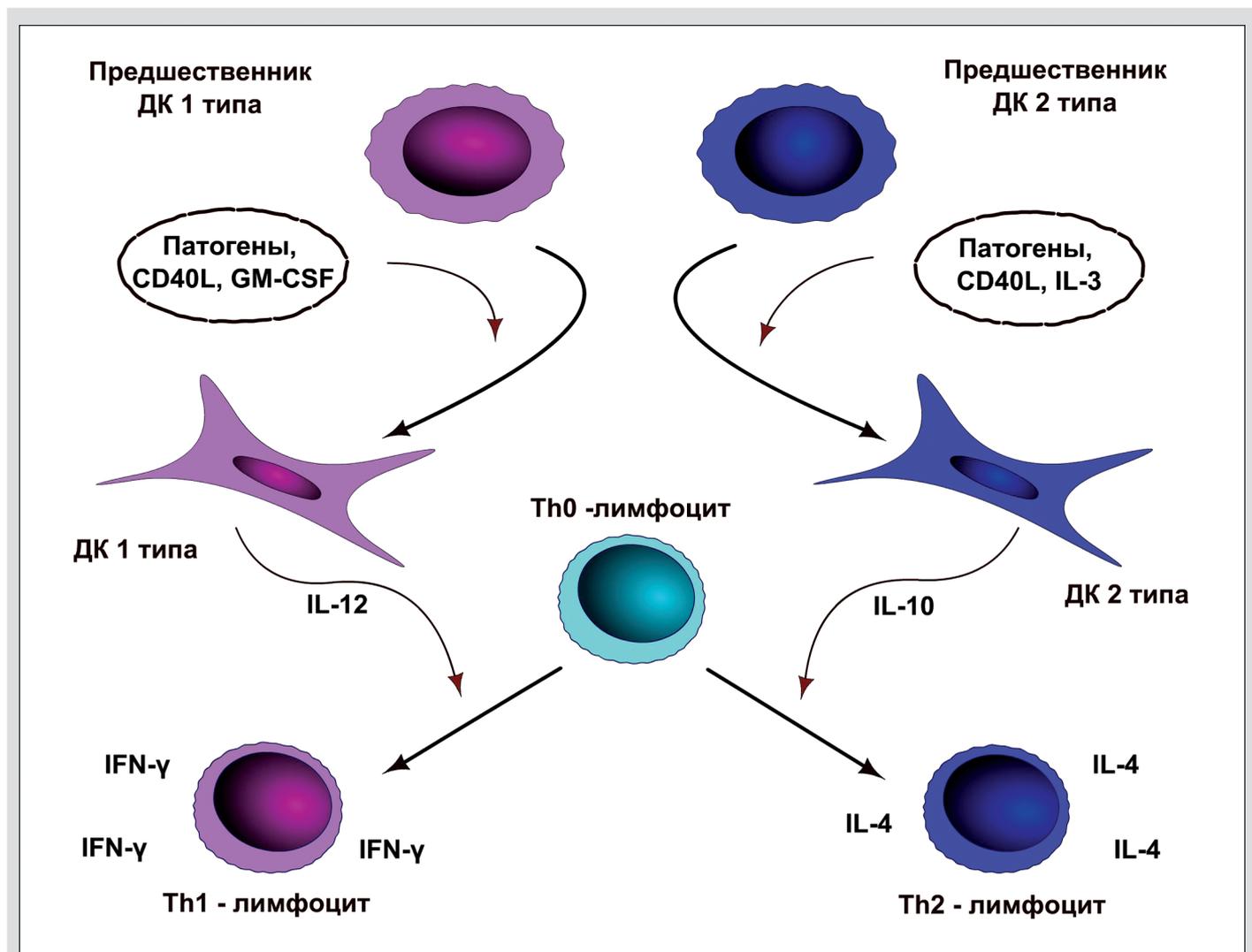
ДК1 характеризуются продукцией IL-12, главного фактора дифференцировки IFN- $\gamma$ -продуцирующих Т-лимфоцитов-хелперов первого типа (Th1) (рис.). ДК2, напротив, не продуцируют IL-12 и стимулируют в основном, дифференцировку незрелых Т-лимфоцитов в Т-лимфоциты-хелперы второго типа (Th2), секретирующие IL-4 [13]. Th1-опосредованный иммунный ответ характеризуется клеточными иммунными реакциями и активацией цитотоксических лимфоцитов; Th2 индуцируют развитие гуморальных иммунных реакций, то есть, главным образом, продукцию антиген-специфических иммуноглобулинов В-лимфоцитами [14].

Основываясь на этих данных, исследователи из группы А.М. Dohnal предположили, что именно Th1-опосредованные цитолитические иммунные реакции являются основными в элиминации опухолевых клеток, то есть реакции, запускаемые IL-12-продуцирующими ДК1. Исходя из этого, они сочли, что противоопухолевая вакцина, разработанная на основе ДК1, будет наиболее эффективна. В клиническом эксперименте приняли участие двадцать два пациента детского и подросткового возраста с различными видами неоплазий: остеосаркомой (с метастазами в костях и лёгких), гепатоцеллюлярной карциномой (с метастазами в кости), саркомой Юинга (с метастазами в лёгких), почечной карциномой и фибросаркомой. Все пациенты до начала

вакцинации получали стандартную противоопухолевую терапию.

Дендритные клетки были получены из моноцитов, выделенных из аутогенного аферезного продукта крови и стимулированы бактериальным липополисахаридом (ЛПС) и IFN- $\gamma$  для максимизации продукции IL-12 [15]. Поскольку продукция IL-12 происходит только в первые 24 часа после созревания ДК [16], культивирование клеток в присутствии стимуляторов продолжалось в большинстве случаев не более 6 часов (за исключением ДК для первых восьми пациентов), после чего в культуру помещали суспензию опухолевых клеток пациента, полученную из биопсийного материала. Для активации фагоцитоза, процессинга и презентации опухолевых антигенов в культуру в качестве адьюванта добавляли также высокоиммуногенный белок – гемоцианин морского моллюска фиссуреллии (keyhole lymphet hemocyanin, KLH).

Вакцинацию производили либо подкожно (14 пациентов), либо непосредственно в регионарные лимфатические узлы (8 пациентов). Каждый пациент получал по девять инъекций по следующей схеме: три инъекции производились ежедневно в течение трёх недель, после чего следовал трёхнедельный перерыв в вакцинации для развития стойкого клеточного иммунитета. Части пациентов, получавших подкожные инъекции вакцины, производились также инъекции рекомбинантного IFN- $\gamma$  человека.



Регуляция развития иммунного ответа по Th-1 или Th-2 типам разными субпопуляциями дендритных клеток

Для определения эффективности вакцинации были проведены тесты на гиперчувствительность замедленного типа, в которых было показано развитие позитивной реакции на KLH и опухолевые антигены у шести из девяти пациентов, вакцинированных подкожно, и четырёх из шести пациентов, вакцинированных интранодально. Реакция была статистически более выраженной при интранодальном пути вакцинации, нежели при подкожном. Ярко выраженная реакция на опухолевые антигены была отмечена у трёх из шести интранодально вакцинированных пациентов и лишь у двух из девяти пациентов, вакцинированных подкожно. Была также оценена продукция IFN- $\gamma$  T-лимфоцитами до и после вакцинации и получены статистически достоверные данные о том, что активность Th1-лимфоцитов после применения дендритноклеточной вакцины существенно повышается у всех пациентов, вакцинированных интранодально, и только

у трёх пациентов, получивших подкожные инъекции. Серьёзных побочных эффектов вакцинации выявлено не было, однако в целом не было отмечено какого-либо положительного эффекта на клиническое течение заболевания. Тем не менее, в данной фазе исследования трудно что-либо говорить о какой-либо эффективности.

Таким образом, противоопухолевая вакцинация дендритноклеточными вакцинами эффективна для стимуляции цитотоксических реакций и безопасна для пациентов. Это первая работа, в которой для вакцинации использовались ДК1. ДК1 могут быть получены в достаточном количестве из продукта афереза крови пациента. Дальнейшие клинические испытания должны проводиться на более однородных группах пациентов для определения эффективности применения IL12-секретирующих ДК1 в терапии отдельных форм неоплазий.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Орлова Р.В. и др. Способ иммунотерапии опухолевым лизатом с адьювантом беталейкин больных с солидными опухолями. Патент РФ RU2267326.
2. Banchereau J., Briere F., Caux C. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 767–811.
3. Felzmann T., Gadner H., Holter W. Dendritic cells as adjuvants in antitumor immune therapy. *Onkologie.* 2002; 25: 456–64.
4. Geiger J.D., Hutchinson R.J., Hohenkirk L.F. et al. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res.* 2001; 61: 8513–9.
5. Dagher R., Long L.M., Read E.J. et al. Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: an inter-institute NIH study. *Med. Pediatr. Oncol.* 2002; 38: 158–64.
6. Labeur M.S., Roters B., Pers B. et al. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol.* 1999; 162: 168–75.
7. Mazzaccaro R.J., Gedde M., Jensen E.R. et al. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by Mycobacterium tuberculosis infection. *PNAS.* 1996; 93: 11786–91.
8. Simmons C.P., Mastroeni P., Fowler R. et al. MHC class I-restricted cytotoxic lymphocyte responses induced by enterotoxin-based mucosal adjuvants. *J Immunol.* 1999; 163: 6502–10.

9. Cho H.J., Takabayashi K., Cheng P.M. et al. Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism. *Nat Biotechnol.* 2000; 18: 509–14.
10. Ridge J.P., Di-Rosa F., Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* 1998; 393: 474–8.
11. Sigal L.J., Crotty S., Andino R., Rock K.L. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature.* 1999; 398: 77–80.
12. Liu Y.-J., Kanzler H., Soumelis V., Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 585–9.
13. Kalinski P., Hilkens C.M., Wierenga E.A., Kapsenberg M.L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* 1999; 20: 561–7.
14. Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989; 7: 145–73.
15. Felzmann T., Huttner K.G., Breuer S.K. et al. Semi-mature IL-12 secreting dendritic cells present exogenous antigen to trigger cytolytic immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* 2005; 54: 769–80.
16. Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A., Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 2000; 1: 311–6.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Dohnal A.M., Witt V., Huegel H. et al. Phase I study of tumor Ag-loaded IL-12 secreting semi-mature DC for the treatment of pediatric cancer. *Cytotherapy* 2007; 9: 755–70

## Котрансплантации гемопоэтических и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при онкогематологических заболеваниях увеличивают риск развития рецидивов

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является общепринятым методом терапии многих заболеваний [1–3]. Одно из самых частых и тяжёлых осложнений этого метода – реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Даже в случае полной HLA-совместимости донора и реципиента острая РТПХ развивается в 35% случаев, а хроническая – в 50% [4, 5]. Иммуносупрессивная терапия кортикостероидными препаратами достаточно эффективна для предотвращения острой РТПХ, однако она, в свою очередь, может приводить к осложнениям, среди

которых наиболее значимо возникновение тяжёлых сопутствующих инфекций. Также существуют тяжёлые формы РТПХ, устойчивые к стероидам, которые на данный момент остаются практически неизлечимыми [6]. Полное удаление из трансплантата донорских T-лимфоцитов, снижая интенсивность РТПХ, одновременно повышает риск развития рецидива основного заболевания и несостоятельности трансплантата [7, 8].

Помимо ГСК, костный мозг млекопитающих содержит ещё одну популяцию стволовых клеток – мультипотентных

мезенхимальных стромальных (ММСК), обладающих способностью к дифференцировке в клетки мезенхимного происхождения [9] и секретирующих ряд колониестимулирующих факторов и цитокинов, необходимых для гемопоэза [10]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических испытаниях было показано, что ММСК обладают иммуносупрессивными свойствами [11–13]. Поскольку при внутривенных трансфузиях ММСК не было выявлено негативных побочных эффектов, эти исследования могут найти скорое применение в клинике. Клинические испытания котрансплантации ГСК и ММСК показали, что ММСК снижают риск несостоятельности трансплантата и возникновения РТПХ [14, 15].

В журнале *Leukemia* опубликованы результаты пилотного клинического исследования научной группы Н. Ning, целью которого было определение терапевтического потенциала и возможных побочных эффектов котрансплантации ГСК и ММСК пациентам с онкогематологическими заболеваниями. Несмотря на существующие положительные данные относительно котрансплантации этих двух типов стволовых клеток, исследователи задались вопросом об отдаленных последствиях введения ММСК, принимая во внимание их свойство системной иммуносупрессии. Ранее был продемонстрирован рост некоторых злокачественных новообразований у мышей–реципиентов на фоне системной иммуносупрессии, опосредованной ММСК [16].

В исследовании приняло участие 30 пациентов со следующими онкогематологическими заболеваниями: миелодиспластический синдром (МДС), неходжкинская лимфома (НХЛ), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ). Пациенты были случайным образом разделены на две равные группы. Пациентам из контрольной группы была проведена стандартная трансплантация ГСК, выделенных из костного мозга либо полученных из аферезного продукта периферической крови после процедуры мобилизации ГСК HLA-идентичных доноров. Остальные пациенты получили помимо трансплантации ГСК также внутривенные трансфузии ММСК от HLA-идентичных доноров. В статье не упоминается, были ли трансплантированные каждому пациенту из экспериментальной группы ГСК и ММСК получены от одного и того же донора, хотя этот вариант кажется наиболее очевидным.

Выделенные из костного мозга ММСК имели следующий иммунофенотип: CD73<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/

CD45<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>. Их количество составляло от 0,3 до 15,3×10<sup>5</sup> клеток на килограмм веса пациента в связи с индивидуальными различиями пролиферации культур ММСК *in vitro*. По этой причине в дальнейшем был проведен анализ зависимости развития РТПХ от количества пересаженных ММСК, однако значимой корреляции с эффектом выявлено не было.

Рецидивы основного заболевания наблюдались у пациентов, получивших наименьшую и наибольшую дозы ММСК. Тем не менее, в выводах исследователи этого не учитывают, говоря о рисках развития рецидивов основного заболевания вне зависимости от дозы трансплантированных ММСК и полагаясь на отсутствие статистически выявленной корреляции. В то же время результат в виде отсутствия статистически достоверной корреляции дозы ММСК и вероятности рецидива был предсказуем. Однако говорить об отсутствии фактической связи количества трансплантированных ММСК и вероятности рецидива заболевания было бы неверно. Вывод в этом случае может оказаться противоположным тому, который сделали из полученных результатов авторы, учитывая, что у пациентов, получивших 0,3 и 0,4×10<sup>5</sup> клеток на килограмм веса, впоследствии развились рецидивы, в то время как у пациентов, получивших 3,4 и 11,0×10<sup>5</sup> клеток на килограмм веса, рецидивов не наблюдалось.

Главным результатом этой работы можно считать вывод о том, что в случае котрансплантации ГСК и ММСК возрастает риск рецидива основного заболевания (табл.). В группе пациентов, получивших стандартную терапию, рецидивы наблюдались в 20% случаев. При трансфузии ММСК этот показатель возрастал до 60%. Период наблюдения составлял 4 года. Было показано, что при котрансплантации ММСК рецидив наступал значительно раньше: в среднем через 63 сут. после трансплантации, в то время как при стандартной трансплантации средний период до возникновения рецидива составлял 177 сут. Таким образом, это подтверждает данные о том, что аллогенные ММСК способствуют пролиферации и выживанию опухолевых клеток *in vivo* [16].

В то же время котрансплантация ММСК независимо от их концентрации с высокой вероятностью предотвращает развитие РТПХ. Все пациенты в качестве профилактики РТПХ получали стандартную терапию метотрексатом и циклоспорином. Острая РТПХ в контрольной группе развивалась в 53,3% случаев, а в экспериментальной группе этот показатель составил 11%. Хроническая РТПХ была отмечена в 28,6% и 14,3% случаев соответственно.

#### Клинические исходы у пациентов опытной (с введением ММСК) и контрольной групп.

Клинические исходы	Опытная группа (n = 10)	Контрольная группа (n = 15)
Восстановление гемопоэза (дни):		
– нейтрофилы > 0,5×10 <sup>9</sup> /л	16 (12–21)	15 (11–20)
– тромбоциты > 50×10 <sup>9</sup> /л	30 (16–45)	27 (15–64)
Острая РТПХ:		
– I–II степени	11,1% (1/9)	53,3% (8/15)
– III–IV степени	0	0
Хроническая РТПХ	14,3% (1/7)	28,6% (4/14)
Инфекционные осложнения	40,0% (4/10)	33,3% (6/15)
Рецидивы основного заболевания	60,0% (6/10)	20,0% (3/15)
Общая выживаемость (3 года)	40,0% (4/10)	66,7% (10/15)

Котрансплантация ГСК и ММСК, вопреки ожиданиям исследователей, не приводила к стимуляции восстановления кроветворения. Возможно, это было связано с недостаточным количеством ММСК, пересаженных пациентам. В других клинических исследованиях было показано, что при котрансплантации с аллогенными ГСК ММСК в количестве  $1,0-2,8 \times 10^6$  клеток на килограмм веса пациента достигается ускоренное восстановление кроветворения в сравнении с контрольной группой [10].

Несмотря на то, что это клиническое исследование было пилотным и в нём приняло участие всего 30 пациентов с разными заболеваниями, его результаты указывают на определенный риск подобных котрансплантаций при онкогематологических заболеваниях. При этом подтверждаются данные доклинических экспериментов на клетках животных и более ранних клинических исследований, в которых была

показана способность ММСК снижать риск развития и остроту РТПХ [14,15].

Исследователи предполагают, что ММСК могут препятствовать развитию реакции «трансплантат против опухоли», подавляя иммунокомпетентные клетки, образующиеся из трансплантированных пациенту ГСК. Этим также может быть объяснено повышение частоты рецидивов основного заболевания. Авторы считают, что котрансплантация ММСК может быть более эффективна и иметь больший терапевтический эффект при незлокачественных заболеваниях крови, делая на основании полученных данных вывод об опасности трансплантации ММСК в случае присутствия в организме пациента опухолевых клеток. Таким образом, для подтверждения данных настоящего исследования требуется проведение более широкомасштабного рандомизированного клинического исследования.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Armitage J.O. Bone marrow transplantation. N. Engl. J. Med. 1994; 330: 827-38.
2. Yeager A.M.. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in inborn metabolic diseases. Ann. Hematol. 2002; 81: 16-9.
3. Burt R.K., Traynor A.E., Craig R., Marmont A.M. The promise of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. Bone Marrow Transplant. 2003; 31: 521-4.
4. Wingard J.R., Vogelsang G.B., Deeg H.J. Stem cell transplantation: supportive care and long-term complications. Hematology 2002, 422-44.
5. Tabbara I.A., Zimmerman K., Morgan C., Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. Arch. Intern. Med. 2002; 162: 1558-66.
6. Antin J.H., Chen A.R., Couriel D.R. et al. Novel approaches to the therapy of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. Biol. Blood Marrow Transplant. 2004; 10: 655-68.
7. Ferrara J.L., Deeg H.J.. Graft-versus-host disease. N. Engl. J. Med. 1991; 324: 667-74.
8. Marmont A.M., Horowitz M.M., Gale R.P. et al. Depletion of HLA-identical transplants in leukemia. Blood 1991; 78: 2120-30.
9. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-7.
10. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery

after co-infusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. J. Clin. Oncol. 2000; 18: 307-16.

11. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp. Hematol. 2002; 30: 42-8.
12. Krampera M., Glennie S., Dyson J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood 2003; 101: 3722-9.
13. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow Leukemia stromal cells: implications in transplantation. Transplantation 2003; 75: 389-97.
14. Frassoni F., Labopin M., Bacigalupo A. et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), coinfused with HLA identical hematopoietic stem cells transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: a matched pair analysis in hematologic malignancy patients. Bone Marrow Transplant. 2002; 29 (suppl 2): S2 [Abstract 75].
15. Le Blanc K., Rasmussen I., Sundberg B. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet 2004; 363: 1439-41.
16. Djouad F., Plence P., Bony C. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. Blood 2003; 102: 3837-44.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Ning H., Yang F., Jiang M. et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. Leukemia 2008; 22: 593-9

## Кратковременная селективная деплеция Т-лимфоцитов может приводить к регрессии метастазов у пациентов с меланомой

Одной из наиболее приоритетных прикладных задач современной иммунологии является разработка новых методов лечения злокачественных новообразований. Несмотря на то, что прогресс в данной области пока невелик, в настоящее время сформировалось несколько направлений противоопухолевой иммунотерапии, находящихся на стадии клинических испытаний или уже внедренных в клиническую практику. Наиболее эффективным из них является адаптивная клеточная терапия (адаптивная иммунотерапия) [1].

Адаптивная клеточная терапия (АКТ) заключается в идентификации *ex vivo* ауто- или аллогенных лимфоцитов с противоопухолевой активностью, их экспансию и последующее введение пациентам совместно с факторами роста,

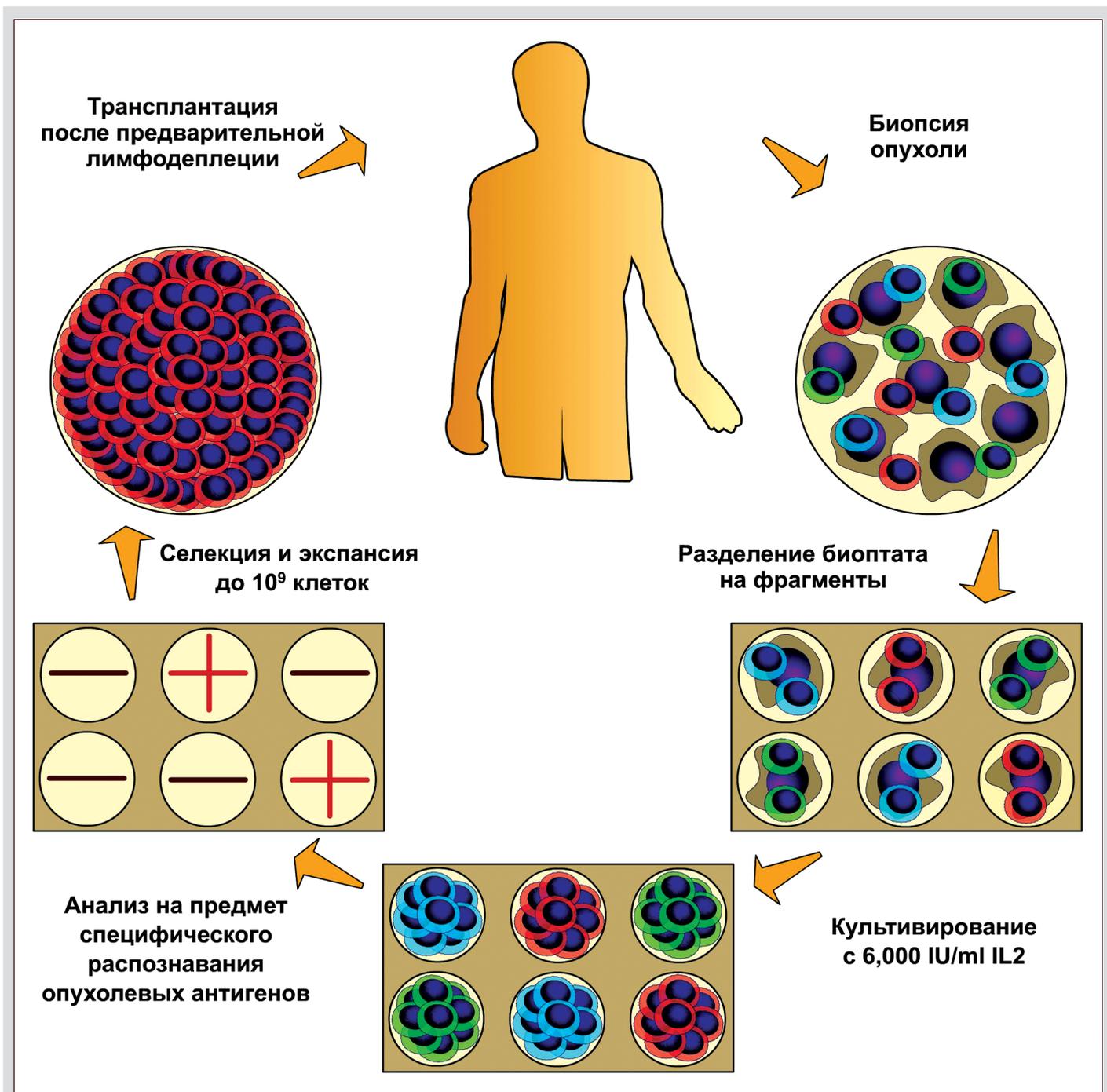
стимулирующими выживание и пролиферацию клеток *in vivo* (рис.). Важным этапом в разработке АКТ стала публикация в 1987 году научной группой S. Rosenberg результатов исследования, согласно которым специфичные в отношении опухолевых антигенов лимфоциты, инфильтрирующие меланому (tumour-infiltrating lymphocytes, TIL), были подвергнуты экспансии *in vitro* в присутствии IL-2 [2]. Первые клинические испытания показали относительно высокую эффективность АКТ у тяжелых пациентов с IV стадией меланомы, частота объективного клинического ответа у которых достигала 35% [3]. Однако, в этих же испытаниях был обнаружен ряд существенных недостатков АКТ с использованием TIL, одним из которых являлась короткая продолжительность

жизни трансплантированных лимфоцитов [4]. Кроме того, важная информация была получена в исследованиях на экспериментальных моделях новообразований у мышей. Было показано, что противоопухолевый иммунный ответ активно подавляется регуляторными Т-клетками [5]. Более того, деплеция  $CD4^+/CD25^{high}$  регуляторных Т-клеток с использованием анти- $CD25$  антител приводила к индукции выраженного Т-клеточного иммунного ответа против прогрессирующей меланомы у мышей [6, 7], а также ряда других злокачественных новообразований [8, 9].

Таким образом, эти данные служили основанием для важного вывода о том, что перед трансплантацией лимфоцитов необходимо проведение подготовительных мероприятий в

виде обратимой лимфодеплеции, целью которой является удаление как регуляторных Т-лимфоцитов, так и эндогенных лимфоцитов, которые могут конкурировать с введенными Т-клетками за ключевые факторы роста [10]. Это привело к разработке современных клинических протоколов АКТ, включающих предварительную немиелоаблятивную химиотерапию, которые позволили повысить частоту клинического ответа у больных с IV стадией меланомы до 50% [11].

Перспективным направлением дальнейшего совершенствования АКТ является разработка селективных методов деплеции лимфоцитов, направленных, в первую очередь, на уничтожение  $CD4^+/CD25^{high}/Foxp3^+$  регуляторных Т-клеток. Одним из препаратов, которым можно добиться подобного



Адаптивная клеточная терапия

эффекта, является Denileukin diftotox (DAB/IL2), который представляет собой рекомбинантный цитотоксический белок, состоящий из фрагментов А и В дифтерийного токсина и молекулы IL-2. DAB/IL2 эффективно связывается с CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора к IL-2) на поверхности Т-лимфоцитов, проникает внутрь клетки и ингибирует синтез белка, приводя к гибели клетки в течение нескольких часов [12].

Результаты исследования, опубликованного научной группой J. Chesney в Journal of Translational Medicine свидетельствуют, что введение DAB/IL2 пациентам с IV стадией меланомы не только приводит к кратковременной деплеции Т-лимфоцитов, но и может стимулировать выраженный противоопухолевый иммунный ответ.

В исследовании принимали участие 16 человек с меланомой кожи и/или слизистых оболочек с наличием множественных метастазов. Для оценки клинического ответа все пациенты подвергались обследованию на компьютерном (КТ) и позитронно-эмиссионном (ПЭТ) томографах за 1 месяц перед началом приема и через 1 месяц после последнего приема препарата. DAB/IL2 применялся в следующем режиме – внутривенное введение 12 мкг/кг 1 раз в сутки в течение 4 суток. Каждый пациент получил от 1 до 4 циклов введения препарата, с перерывом между циклами в 3 недели. Клинический ответ оценивался по критериям RECIST (The Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) [13].

Уже первое введение препарата вызывало значительное снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов в крови. Уровни CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов падали более чем на 50% в течение 28–42 часов после начала лечения. В течение 72 часов практически полностью исчезали CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>+</sup> регуляторные Т-лимфоциты. Субпопуляция CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Т-клеток также снижалась в численности, хотя и в менее значительных масштабах, возможно, благодаря не-прямому механизму из-за гибели CD25<sup>+</sup> лимфоцитов. В течение 21 дня количество клеток всех популяций лимфоцитов приходило в норму.

4 пациента получили 4 цикла введения препарата. При проведении 2–4 циклов лечения у них отмечалось менее выраженное снижение количества лимфоцитов, чем при проведении первого цикла. Это явление ассоциировалось с появлением в крови анти-DAB/IL2 IgG. После проведения 4 циклов уровень CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток снижался в значительно большей степени относительно CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (70-е сут. после начала лечения – CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>+</sup> Т клетки = 37±16% от контроля; CD8<sup>+</sup> Т-клетки = 128±48% от контроля; n=4; p=0,031).

У 7 пациентов, принимавших участие в испытании, анализировалось наличие в крови CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфичных к антигену меланомы MART1. До начала лечения DAB/IL2 данная субпопуляция CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в крови не определялась. Тем не менее, формирование *de novo* MART1-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток наблюдалось у 4 из 7 пациентов уже после окончания первого цикла введения препарата. Эти данные свидетельствуют, что кратковременная деплеция Т-лимфоцитов в дальнейшем может сопровождаться экспансией эффекторных Т-лимфоцитов, специфичных к опухолевому антигену.

Лечение DAB/IL2 привело к частичному клиническому ответу у 5 пациентов и прекращению опухолевой прогрессии у 1 пациента (31%). Лишь у 2 из 4 пациентов с форми-

рованием *de novo* MART1-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток наблюдалась регрессия метастазов. У двоих пациентов регрессия одних групп метастазов одновременно сопровождалась прогрессией других групп. У одного пациента с полной регрессией многочисленных метастазов печени, легких и средостения два резидуальных метастаза были удалены хирургическим путем. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование резецированного материала показало, что опухоль была инфильтрирована CD8<sup>+</sup>, при отсутствии CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Однако клетки меланомы не экспрессировали молекулы HLA-A, В или С, необходимые для распознавания опухолевых клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами.

В целом введение препарата в указанных режиме и дозах характеризовалось малой токсичностью и единичными осложнениями (слабость, эритема, дерматит, артрит).

Учитывая полученные результаты, авторы предположили, что DAB/IL2 может иметь прямой цитотоксический эффект на клетки меланомы. Тем не менее, экспозиция препарата с пролиферирующими клетками меланомы *in vitro* в концентрациях, превышающих в 15 раз максимальную концентрацию препарата в плазме, не имело какого-либо эффекта.

Таким образом, кратковременная деплеция CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у пациентов с меланомой, опосредованная введением DAB/IL2, приводила к обновлению Т-клеток крови и (у части пациентов) формированию *de novo* CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных к антигенам меланомы. Тем не менее, не у всех пациентов появление специфичных к антигенам меланомы Т-лимфоцитов приводило к регрессии опухоли. Более того, у 2 пациентов наблюдался смешанный клинический ответ – одни метастазы регрессировали, тогда как другие прогрессировали. Это явление может объясняться различием в экспрессии клетками опухоли молекул МНС, наличие которых необходимо для их распознавания Т-лимфоцитами. В пользу данного предположения свидетельствует отсутствие молекул HLA-A, В или С у опухолевых клеток резидуальных метастазов одного из пациентов.

Ранее уже были опубликованы результаты клинического исследования с введением DAB/IL2 12 пациентам с IV стадией меланомы [14]. Однако в этом исследовании не было обнаружено каких-либо признаков регрессии или стабилизации заболевания, а также значительного снижения экспрессии специфического для регуляторных Т-клеток фактора транскрипции Foxp3 и подавления супрессивной активности CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup> лимфоцитов. Причина возникших противоречий может быть объяснена разными режимами и дозами введения препарата, а также небольшим количеством пациентов, участвующих в испытании.

Полученные в исследовании результаты могут стать существенным стимулом для разработки новых, более эффективных клинических протоколов АКТ. Подготовительные мероприятия в виде специфической кратковременной деплеции преимущественно CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов могут иметь существенный терапевтический эффект, чего не наблюдается при проведении немиелоаблятивной химиотерапии. Более того, существуют веские основания для мнения, что предшествующая кратковременная деплеция Т-лимфоцитов, особенно регуляторных Т-клеток, может значительно усилить терапевтические эффекты введения противоопухолевых вакцин [15].

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Rosenberg S., Restifo N., Yang J., Morgan R., Dudley M. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer 2008; 8: 299–308.
2. Muul L., Spiess P., Director E., Rosenberg, S. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. J. Immunol. 1987; 138: 989–95.

3. Rosenberg S., Yannelli J., Yang J. et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. J. Natl. Cancer Inst. 1994; 86: 1159–66.

4. Rosenberg S., Aebersold P., Cornetta K. et al. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N. Engl. J. Med. 1990; 323: 570–8.

5. Jones E., Dahm-Vicker M., Golgher D., Gallimore A. CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and tumor immunity. *Immunol. Lett.* 2003; 85:141–3.
6. Jones E., Dahm-Vicker M., Simon A. et al. Depletion of CD25<sup>+</sup> regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun.* 2002; 2: 1.
7. Turk M., Guevara-Patino J., Rizzuto G. et al. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 771–82.
8. Onizuka S., Tawara I., Shimizu J. et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999; 59: 3128–33.
9. Shimizu J., Yamazaki S., Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 1999; 163: 5211–8.
10. Gattinoni L., Finkelstein S., Klebanoff C. et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 907–12.

11. Dudley M., Wunderlich J., Yang J. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 10: 2346–57.

12. Frankel A., Surendranathan A., Black J. et al. Phase II clinical studies of denileukin diftotox diphtheria toxin fusion protein in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2006, 106: 2158–64.

13. Therasse P., Eisenhauer E., Verweij J. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment. *Eur. J. Cancer.* 2006; 42: 1031–9.

14. Attia P., Maker A., Haworth L., Rogers-Freezer L., Rosenberg S. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftotox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J. Immunother.* 2005; 28: 582–92.

15. Dannull J., Su Z., Rizzieri D. et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2005, 115: 3623–33.

Подготовил В.С. Сергеев

По материалам: Rasku M., Clem A., Chesney J. et al. *Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. J. Translat. Med.* 2008; 6: 12

## Технология АСІ или ССІ: рандомизированное клиническое исследование трансплантации аутогенных хондроцитов при травмах коленного сустава

Несмотря на то, что клинический опыт применения аутохондробластов по технологии АСІ (autologous chondrocytes implantation) скоро отметит 15-летний юбилей, споры об эффективности метода не утихают, хотя проведено более 22 различных рандомизированных клинических исследований [12 000 пациентов], показавших большую эффективность данного метода по сравнению с традиционными методами лечения [1–4]. Ряд биотехнологических компаний разработали и уже более 13 лет эффективно применяют данную технологию для лечения суставных повреждений и дегенеративных заболеваний хрящевой ткани. Тем не менее, каждый новый коммерческий продукт проходит все этапы тестирования, прежде чем получит широкое применение. Увеличение количества научных данных о безопасности и эффективности данной технологии приводит к появлению на рынке новых продуктов, что усиливает конкурентную борьбу между биотехнологическими компаниями.

Одной из модификаций АСІ является технология ССІ – Characterized Chondrocyte Implantation (TiGenix). Отличие этого технологического процесса заключается в генетическом контроле фенотипа клеточной культуры на выходе. Компания TiGenix (Бельгия) под эгидой Американского общества спортивной медицины провела мультицентровое исследование эффективности и безопасности клеточного продукта ChondroSelect, созданного для технологии АСІ.

В международном мультицентровом рандомизированном клиническом исследовании приняло участие 118 человек с травматическими повреждениями суставной поверхности бедренной или большеберцовой костей (61 – стандартное лечение, 57 – АСІ). Во время артроскопии производилась первичная обработка места повреждения хряща, получение тканевого материала, после чего пациенты распределялись

в случайном порядке в одну из групп. Через месяц проводились трансплантации.

Обе группы пациентов в течение первых двух недель воздерживались от противовоспалительных средств. Конечность иммобилизовалась на 8 недель с разгрузкой сустава, а после биопсии еще на 6 недель. Под контролем физиотерапевта пациенты проходили курс реабилитации.

Через 12 мес. проводилось гистологическое исследование тканей в области трансплантации с определением гистологической структуры и иммуногистохимическое исследование внеклеточного матрикса. Безопасность оценивалась по клиническому и лабораторному мониторингу функционирования основных систем организма.

В результате скорость реабилитации и наступления выздоровления были быстрее в группе трансплантации. Ни у одного пациента не было отмечено серьезных осложнений, требующих дополнительных вмешательств и исключения из исследования. Были получены статистически достоверные данные об отсутствии гиперплазии хрящевой ткани в месте трансплантации, тогда как в группе сравнения она наблюдалась. Гистоморфологическое исследование продемонстрировало наличие типичной зрелой хрящевой ткани в месте трансплантации и отсутствие признаков фиброза в группе с ССІ в отличие от группы сравнения. Анализ данных других рандомизированных клинических исследований технологии АСІ также демонстрирует недостаточность данных по гистологической характеристике хрящевой ткани, полученной после трансплантации, что, по мнению авторов, представляет данное исследование более выигрышным, а результат прогнозируемым.

Таким образом, проведенное исследование показало, что новое поколение ауто трансплантатов для восстановления целостности хрящевой ткани, так же безопасно и эффективно как и технология АСІ. Ее появление на рынке высоких био-



технологических продуктов и технологий неминуемо приведет к улучшению качества трансплантатов, а продолжающиеся клинические исследования в скором времени

поставят точку в спорах о безопасности и эффективности клеточных технологий, по крайней мере, для технологий точной хондропластики.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A. et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994; 33: 889–95.
2. Chen F.S., Frenkel S.R., Di Cesare P.E. Chondrocyte transplantation and experimental treatment options for articular cartilage defects. *Am. J. Orthop.* 1997; 26(6): 396–406.

3. Fu F.H., Zurakowski D., Browne J.E. et al. Autologous chondrocyte implantation versus debridement for treatment of full-thickness chondral defects of the knee: an observational cohort study with 3-year follow-up. *Am. J. Sports Med.* 2005; 33(11): 1658–66.

4. Bentley G., Biant L.C., Carrington R.W. et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J. Bone Joint. Surg. Br.* 2003; 85(2): 223–30.

*Подготовил А.В. Волков*

*По материалам: Saris D., Vanlauwe J., Victor J. et al. Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am. J. Sports Med.* 2008; 36: 235–46*