

Смолянинов А.Б., Жаров Е.В., Мовчан К.Н., Обрезан А.Г., Адылов Ш.Ф.

## Клеточные и генные технологии в трансплантационной тканевой инженерии

Санкт-Петербургский Государственный университет  
Санкт-Петербургская Государственная Медицинская академия последипломного образования  
ЦКБ РАН (Москва)  
Покровский банк стволовых клеток (Санкт-Петербург)

Генной терапией называют изменение генов для лечения заболеваний. Наиболее часто при этом выполняется постоянная интеграция нормального гена в ДНК стволовой клетки. При экспрессии внедренный нормальный ген дает терапевтический эффект за счет замещения или выполнения функции отсутствующего или мутантного гена [1, 3, 9].

В рамках генной терапии проводится изучение возможности вставлять гены в стволовые клетки пуповинной крови (СК-ПК) или стволовые клетки костного мозга (СК-КМ). Замещение генов может оказаться полезным при заболеваниях сердца (инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность), гепатологии (хронические гепатиты, циррозы печени), травматологии и ортопедии, ферментных дефицитах (талассемии, тяжелом комбинированном иммунодефиците (SCID), болезни Гоше и муковисцидозе (МВ), генных нарушениях (серповидно-клеточной анемии), а также для индукции селективной гибели клеток в онкологии (эта методика направлена на раковые клетки, и использует «гены самоубийства»).

В перспективе генная терапия может использоваться для лечения как генетических, так и инфекционных (СПИД) за-

болеваний. Кроме того, существуют протоколы генной терапии, где внедренный в клетку ген специфическим образом вызывает гибель злокачественных клеток без повреждения нормальных гемопоэтических клеток. Приблизительно 2000 пациентов во всем мире уже участвовали в клинических исследованиях генной терапии по 250 различным протоколам. Для доставки генов в клетки используются различные вирусы. Приблизительно в 60% используемых в настоящее время протоколов применяются ретровирусные векторы, в 12% – аденовирусы и в 1% – аденоассоциированный вирус (ААВ). Однако, в связи с возникновением случаев лейкоза при применении ретровирусов в исследовании генной терапии у пациентов со SCID, набор пациентов в исследования генной терапии замедлился [5].

В свете этих недавно выявленных нежелательных реакций в клинических исследованиях генной терапии на первый план выходит вопрос обеспечения безопасности пациентов. Кроме того, трудности связаны с разработкой оптимальных методов доставки генетического материала в клетку, переноса ДНК в ядро и индукции экспрессии вставленного гена. В зависимости от конкретных задач, для некото-

рых генов требуется долговременная экспрессия (замещение недостающего гена глобина при талассемии), и поэтому требуется их введение в геномную ДНК клеточной популяции, которая проживет достаточно долго. Для других генов может требоваться лишь транзиторная экспрессия (для индукции гибели опухолевых клеток). Для каждой задачи требуются уникальные генетические элементы для вставки в определенные векторы, обеспечивающие определенный уровень экспрессии гена в необходимой ткани. При генной терапии может производиться замещение отсутствующего или поврежденного гена или создаваться антисмысловая или рибосомная РНК, что обеспечивает желаемый терапевтический эффект за счет изменения образования продуктов эндогенных генов [7].

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), СК-ПК и СК-КМ представляют собой хороший объект для исследований генной терапии. Их можно легко получить и инкубировать *ex vivo* с векторами, содержащими генетический материал. Кроме того, поскольку ГСК циркулируют в организме, их можно использовать для доставки генов при негематологических заболеваниях. В идеале, требуется только инфицировать «стволовую» клетку, чтобы получить значительную амплификацию и длительную направленную экспрессию трансгена.

Векторы для генной терапии могут действовать на клетки *ex vivo*, после чего клетки вводят обратно пациенту, или векторы могут вводиться напрямую пациенту и действовать *in vivo*. До настоящего времени в большинстве исследований на животных и человеке использовалось инфицирование клеток ретровирусами *ex-vivo*. Это позволяет перед использованием отбирать клетки, инфицированные вирусом. Инфицирование *in vivo* использовалось преимущественно в клинических исследованиях лечения больных МВ. Пациентам давали вдыхать аденовирусные векторы с геном, который несет мутацию при МВ (ген белка ионного канала CFTR), после чего вирус инфицирует клетки дыхательного эпителия. Недостатком аденовирусных векторов является участие в процессе механизмов иммунной системы, которые быстро разрушают векторы *in vivo*. Кроме того, проводится интенсивное изучение невирусных векторов для генной терапии. К разрабатываемым невирусным технологиям относятся липосомы и прямое введение путем инъекции генной пушкой; эти методы не вызывают такой реакции иммунной системы, как использование вирусных векторов [4].

В идеале вектор должен обладать следующими характеристиками:

1. способностью переносить крупный ген,
2. контролируемой инфицирующей способностью,
3. направленностью на определенную мишень,
4. возможностью программирования направленности своего действия,
5. высокой эффективностью инфицирования,
6. контролируемой, персистирующей ткань-специфической экспрессией,
7. отсутствием способности к репликации *in vivo*,
8. контролем места интеграции, что позволяет предотвратить неспецифическое действие,
9. низкой иммуногенностью,
10. отсутствием цитотоксического действия,
11. низкой вероятностью возникновения осложнений у пациентов.

Ни один из существующих в настоящее время векторов не соответствует этим требованиям полностью. В данном кратком обзоре основное внимание обращается на биологию трех наиболее хорошо изученных векторных систем, которые использовались в клинических исследованиях по инфицированию гемопоэтических клеток – ретровирусы, адено-ассоциированный вирус (ААВ) и аденовирусы [10].

**Ретровирусы**, которые имеют диаметр около 100 нм и геном в виде одноцепочечной РНК, первыми были использованы в качестве векторов для генной терапии. Большинство ретровирусных векторов созданы на основе вирусов лейкоза мышей. Для того, чтобы обеспечить безопасное использование этих вирусов в генной терапии проводится удаление большей части нормальных генов ретровирусов и ее замещение геном, который вставляют между двумя последовательностями длинного терминального повтора (LTR). LTR имеют значение при включении терапевтических генов в ДНК клеток, а также нужны для экспрессии вставленных генов. Максимальный размер вставленного гена/генов составляет 8 тысяч пар оснований (kb), что может значительно ограничивать их применение, поскольку кодирующий участок многих генов превышает по размеру 8 kb, и иногда существует потребность введения более чем одного гена (селектируемый маркер).

Для обеспечения безопасности все векторы для генной терапии не должны реплицироваться в организме человека-хозяина. Вирусы, неспособные к репликации (RIR) образуются при удалении или мутации генов *gag*, *pol* и *env* genes. Поскольку после этого способности вируса ограничиваются, для производства ретровирусов для клеточной терапии в большом количестве используют специальные «упаковочные» клетки. После введения в линию упаковочных клеток вектора, содержащего ретровирусные LTR и подачи сигнала к упаковке РНК вируса упаковывается в вирусные белки, кодируемые клеткой [11].

После этого клетки-мишени обрабатываются содержащим вирус супернатантом, продуцируемым линией упаковочных клеток. Перед тем как клетки подвергают действию супернатанта проводится анализ на способность к репликации ретровирусы, и только безопасный супернатант можно использовать для инфицирования клеток-мишеней. К сожалению, часто концентрация (титр) ретровирусов в супернатанте низкая, и поэтому эффективность трансдукции также низка. В настоящее время ведутся исследования, направленные на повышение трансдукционной эффективности ретровирусов (например, путем добавления фибронектина в среду *in vitro*).

К числу лучших клеток-мишеней для инфицирования ретровирусами *in vitro* относятся ГСК. ГСК с высокой пролиферативной способностью успешно инфицировались ретровирусами. Однако, самым большим препятствием для использования ретровирусов в инфицировании ГСК является то, что ретровирусы обычно не инфицируют клетки вне стадии митоза, а стволовые клетки обычно находятся в фазе G<sub>0</sub> или очень медленно проходят по клеточному циклу. Эффективность инфицирования ранних клеток-предшественников повышается при добавлении цитокинов, таких как IL-3, IL-6, и фактор стволовых клеток (FSC), но эти факторы роста могут вызывать дифференцировку клеток и утрату ими способности к долгосрочной репопуляции (характеристики стволовых клеток).

Была показана возможность достаточно эффективной (80–100%) трансдукции мышинных ГСК с использованием ретровирусных векторов. В доклинических ксеногенных моделях *in vivo*, где трансплантация ГСК человека проводилась животным с иммунодефицитом, были получены довольно успешные результаты. В одной из таких систем человеческие CD34+ клетки костного мозга, инфицированные ретровирусом, сохранялись в организме мышей в течение не менее 8 месяцев [4].

Значительный риск использования ретровирусных векторов в генной терапии был обнаружен после проведения исследований на приматах. Клетки CD34+ для трансплантации инфицировали. Несмотря на отсутствие способных к репликации ретровирусов в супернатанте дальнейшая перестройка приводила к образованию некоторого количества ретровирусов, которые могли реплицироваться. После инфузии у трех из восьми обезьян со временем развились лимфомы, содержащие ретровирусы дикого типа. Достижения в разработке ретровирусных векторов, направленные на снижение вероятности рекомбинации с потенциально имеющимися у хозяина вирусами значительно снизили риск присутствия способных к репликации вирусов. Как упоминалось выше, во всех клинических исследованиях должно проводиться тщательное тестирование на неспособность ретровирусного вектора к репликации [8].

В клинических исследованиях с использованием ретровирусов были получены многообещающие результаты. В одном клиническом исследовании ретровирусные векторы, содержащие отсутствующий ген аденозиндезаминазы (АДА) использовались для инфицирования аутологичных СК-ПК, которые после этого вводили трем новорожденным, которым во внутриутробном периоде был установлен диагноз дефицита АДА. Дети до настоящего времени получают перорально полиэтиленгликоль-АДА, поэтому терапевтический эффект введенного трансгена пока не исследовался.

Недавно был разработан первый протокол генной терапии, направленный на полное излечение заболевания. Использовалась трансплантация аутологичных ГСК, трансфицированных ретровирусом, содержащим отсутствующий ген у больных X-сцепленным SCID. До настоящего времени успешное лечение этим методом генной терапии прошли 10 молодых пациентов. К сожалению, энтузиазм, связанный с успехом генной терапии X-SCID снизился из-за того, что двое детей заболели лейкозом [30]. Лейкоз был вызван стабильной интеграцией кодируемой ретровирусом ДНК в участки геномной ДНК, расположенные рядом с онкогенами. Возможно, такая вставка не только активировала онкоген, но трансген (отсутствовавший у пациентов исходно) также кодировал мембранный белок, который является активной субъединицей нескольких рецепторов к факторам роста. Эта нежелательная реакция возникла только после того, как ученые добились длительной стабильной функциональной экспрессии трансгена в ГСК человека. Возникновение лейкоза в связи с интеграцией кодируемой ретровирусом ДНК не явилось неожиданностью для исследователей, которые изучали ретровирусную инфекцию у мышей, которая, как было показано, может индуцировать лейкоз. В настоящее время усилия направлены на разработку вирусных векторов, которые вставляются в определенные места в геномной ДНК (сайт-специфическая интеграция), удаленные от онкогенов.

**Адено-ассоциированные вирусы (ААВ)** – это непатогенный дефектный по репликации вирус, содержащий одноцепочечную ДНК величиной 4,68 тысяч оснований, которому для инфицирования требуются дополнительные факторы. Название ААВ связано с тем, что герпесвирусы, обычно аденовирус, необходимы для инфекции. Преимущество векторов на основе ААВ заключается в возможности инфицировать неделящиеся клетки и в интеграции гена в виде ДНК. Это является потенциальным преимуществом перед ретровирусными векторами, поскольку для оптимальной экспрессии некоторых генов, в частности Р-глобина, требуется присутствие интронов. Геномные клоны генов не могут сразу инкорпорироваться в ретровирусные векторы, поскольку на стадии РНК происходит их сплайсинг из интронов.

Обратных терминальных повторов, которые находятся на каждом конце ААВ, достаточно для упаковки одноцепочечной ДНК в вирусные частицы. Весь домен, кодирующий белки (4,5 тысячи оснований) вектора ААВ можно заместить представляющими интерес генами, при условии, что обратные терминальные повторы на его концах останутся интактными. Упаковка этих векторов в вирионы производится в присутствии белков ААВ (*тер* и *сар*). Это обычно обеспечивается за счет трансфекции векторной плазмиды, содержащей терапевтический ген и поступления плазмиды, содержащей *тер* и *сар* в клетки, инфицированные аденовирусом. Неспособные к репликации векторы ААВ образуются при лизисе клеток с выделением вирионов, после чего производится разрушение «вспомогательного» аденовируса нагреванием. В отсутствие герпесвируса репликация ААВ не происходит, и вирус остается в интегрированном в геном состоянии.

Векторы на основе ААВ эффективно инфицируют костномозговые CD34+ клетки-предшественники [6]. Экспрессия трансгена наблюдается в 80–90% клеток CD34+ в культуре и в 50–95% миелоидных колониеобразующих единиц (КОЕ-М), дифференцирующихся *in vitro*. В моделях трансплантации инфицированных ААВ ГСК у мышей не было выявлено цитотоксической реакции на ААВ. У мышей, которым была проведена трансплантация костномозговых клеток, трансфицированных ААВ, наблюдалась долгосрочная мультилинейная реконституция, и трансген по-прежнему выявлялся через 6 месяцев. У вторичных реципиентов (еще один «тест») на инфицированность стволовых клеток было обнаружено, что трансдуцированные клетки костного мозга составляют небольшое, но значимое количество (1%). В настоящее время ожидаются результаты клинических исследований ГСК человека, инфицированных ААВ [12].

Основная проблема, связанная с использованием ААВ, заключается в том, что инфицирующая способность ААВ различается между лабораториями. К сожалению, одно из объяснений этой варибельности заключается в том, что в разных лабораториях имеется разное количество остающегося интактным аденовируса, который может инфицировать клетки одновременно с ААВ. Усовершенствованные методики эффективного удаления вспомогательного вируса находятся на этапе разработки. Кроме того, поскольку стабильные системы упаковки ААВ еще не до конца разработаны, получить высокий титр чистого ААВ затруднительно. Недавно для использования в генной терапии был предложен «гибрид» вектора ААВ и липосом, где обратные терминальные последовательности ААВ находятся по краям нужного гена,

что облегчает его введение в геномную ДНК хозяина. В отличие от вирусных частиц, в этом случае ДНК упакована в липосомный носитель [14].

**Аденовирусные векторы** широко применялись в моделях лечения МВ, но пока неясно, будут ли они полезны в протоколах генной терапии с использованием гемопоэтических клеток. Аденовирусы – это вирусы, содержащие двуцепочечную ДНК длиной приблизительно 36,000 пар оснований. В ДНК имеются ранние участки, которые экспрессируются в начале вирусного цикла и нужны для репликации ДНК и передачи вируса. Поздние гены, которые кодируют структурные белки, подвергаются транскрипции после репликации ДНК. Известно, что они инфицируют многие виды клеток, и обладают низкой патогенностью. Они сохраняют достаточную стабильность *in vitro*, и их можно получить в более высоком титре. Еще одним преимуществом является их способность инфицировать покоящиеся клетки или клетки после митоза [13].

Вопрос, могут ли аденовирусные векторы инфицировать ГСК или клетки-предшественники, остается спорным. Пока неясно, экспрессирован ли рецептор к аденовирусам на поверхности ГСК и клеток-предшественников. Рецептор к аденовирусам в настоящее время все еще изучается, и инфицирование разных клеток может проходить различными механизмами. После контакта ГСК и аденовирусов наблюдается лишь низкий уровень экспрессии трансгена, и заражаются в основном зрелые моноциты и макрофаги. По меньшей мере, в одной публикации аденовирус использовали для транзитной экспрессии генов в гемопоэтических CD34+ клетках человека после цитокиновой стимуляции [7]. До настоящего времени не было публикаций об использовании аденовирусных векторов в гемопоэтических клетках у мышей. В клинических исследованиях, где аденовирусные векторы использовались в лечении МВ, возникали проблемы, связанные с воспалительным ответом на векторы.

В настоящее время при использовании аденовирусных векторов стоят следующие задачи: преодоление проблемы иммунного ответа хозяина, транзитного характера экспрессии трансгена в связи с отсутствием внедрения в геном и низкая аффинность к ГСК. Случай гибели пациента после введения аденовирусного вектора в печень привел к повышению обеспокоенности безопасностью использования этого вектора в генной терапии [8].

В области генной терапии в последние годы наблюдался значительный прогресс. Получены новые достижения в области дизайна векторов, их доставки *in-vivo*, методик трансплантации тканей, а также понимании патогенеза заболеваний. Усовершенствованы модели доклинических исследований. Все это позволяет совершенствовать протоколы генной терапии, направленные, в конечном итоге, на излечение заболеваний. Сейчас, после того, как было показано, что генная терапия может играть решающую роль в излечении, по меньшей мере, одного заболевания, X-SCID, основной задачей является модификация вирусных векторов для обеспечения безопасности пациентов. Трудными остаются вопросы:

- 1) определения оптимальной концентрации очищенных цитокинов, которая способствует размножению и дифференцировке клеток *in vitro*,
- 2) определения лучших подходящих векторов,
- 3) определения способов специфического включения и выключения генов,

- 4) оптимизации специфического инфицирования клеток,
- 5) обеспечения длительной экспрессии *in vivo*.

По определению, **мезенхимальные стволовые клетки (МСК)** способны к самообновлению и дифференцировке в более дифференцированные виды клеток. В костном мозге существуют два вида стволовых клеток: ГСК, ответственные за образование клеток крови, и МСК. МСК, которые иногда называют стромальными клетками костного мозга, обеспечивают поддержку ГСК. Как и другие стволовые клетки, МСК способны к самообновлению и дают начало, множеству линий мезодермальных клеток, включая остеоциты, хондроциты, адипоциты и гладкомышечные клетки [11]. МСК легко поддаются выделению из костного мозга и культивированию *in vitro*.

Проведенная недавно работа была направлена на установление роли МСК в клинической терапии. МСК обладают несколькими характеристиками, которые делают их привлекательными для клинического применения. Во-первых, их можно выделить и культивировать *in vitro*. Во-вторых, они обладают иммуномодулирующими свойствами. В-третьих, они легко поддаются трансдукции вирусными и невирусными векторами. В-четвертых, существуют данные, что экзогенные МСК после введения направляются в очаги воспаления и участвуют в заживлении ран.

МСК в наибольшем количестве встречаются в костном мозге. Их также можно обнаружить в пуповинной крови, плаценте и амниотической жидкости. После получения аспирата костного мозга фракцию мононуклеарных клеток помещают в пластиковые колбы для культивирования, где МСК растут, прикрепляясь к пластику. Через 3–5 дней культивирования неприкрепившиеся клетки (в основном, ГСК) смывают. Приблизительно 70–85% оставшихся прикрепленных клеток представляют собой МСК. При проведении дополнительных пассажей доля МСК возрастает до 90–95%. В то же время, МСК, не являются бессмертными в культуре. Большинство лабораторий могут поддерживать культуру МСК на протяжении пяти-шести пассажей, и при этом отмечается пролиферация до 40 поколений.

МСК приживаются в очагах воспаления и заживления ран. Например, у животных с переломами костей при инфузии МСК происходит их хоуминг в область перелома. МСК после введения мышам с разорванной брюшиной оседают в месте повреждения брюшины. Как и в случаях переломов костей и повреждения брюшины, метастатические опухоли находятся в микроокружении воспаления и заживления. В одном исследовании МСК, меченные флуоресцентным красителем, вводили мышам с подкожной меланомой. На 2 и 3 день после инфузии МСК обнаруживались в легких, красной пульпе селезенки, печени и в опухоли. Еще через 7 дней легкие, селезенка и печень больше не содержали МСК. В то же время, МСК сохранялись в опухоли. Максимальное содержание МСК в опухоли отмечалось в некротизированном центре и в растущих краях опухоли. В этих областях наиболее выражено воспаление. В данном исследовании здоровая ткань не способствовала хоумингу и/или приживлению МСК.

МСК очень перспективны в отношении использования, как средств доставки белков для терапии. Для трансдукции МСК использовали несколько разных вирусных векторов. Ретровирусные векторы использовали для экспрессии таких белков, как  $\alpha$ -галактозидаза [11], зеленый флуоресцентный протеин [12], и факторы свертывания крови VIII и IX [12].

Особый интерес для лечения опухолей представляют такие модификаторы, как интерферон и фактор некроза опухолей. Было выдвинуто предположение, что МСК, трансдуцированные этими молекулами, можно вводить больным злокачественными новообразованиями. Злокачественные клетки, которые создают микроокружение воспаления и заживления раны, могут привлекать трансдуцированные МСК, что приводит к повреждению патологических клеток.

Наконец, МСК обладают иммуномодулирующими свойствами, которые могут оказаться полезны пациентам, которым проводится трансплантация костного мозга. МСК обладают способностью подавлять пролиферацию лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов. Этот эффект является дозозависимым. Отношение МСК: лимфоциты 1:10 или более приводит к подавлению лимфоцитов. Этот эффект может быть опосредован МСК-индуцированной супрессией развития цитотоксических CD8 лимфоцитов. Поскольку наблюдалось, что введенные МСК направляются в костный мозг, считается, что инфузия МСК после миелоаблятивной химиотерапии может обеспечить формирование стромы, необходимой для гемопоэтических клеток, что позволяет ускорить их приживание. В то же время, в большинстве исследований, где изучался этот вопрос, не было показано долгосрочное приживание МСК у реципиентов после трансплантации костного мозга. Интересно, что было показано, что МСК подавляют реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) при их одновременной трансплантации с аллогенными клетками костного мозга.

МСК – это плюрипотентные стволовые клетки, которые находятся в костном мозге, но также обнаруживаются в периферической крови (редко), пуповинной крови, плаценте и амниотической жидкости. Их клиническое применение очень перспективно. В то же время, об этих клетках еще предстоит многое узнать. Было определено несколько поверхностных маркеров МСК, но их точный иммунофенотип пока не установлен. Вопрос о лучшей среде для культивирования МСК также находится в стадии обсуждения. В разных лабораториях имеются разные данные о том, через сколько поколений МСК можно выделить из культуры. Тем не менее, МСК представляют собой популяцию клеток, которые можно выделять, в различных лабораториях, трансдуцировать, а потом вводить реципиентам. Доставка противоопухолевых белков и ускорение приживания трансплантата костного мозга у реципиентов – это только несколько примеров потенциального клинического применения этих важных клеток.

В экспериментальных моделях с использованием человеческих и мышиных мультипотентных клеток-предшественников взрослого организма (МАРС) их мультипотентность была продемонстрирована в нескольких аспектах. Эти клетки получают одновременно с МСК костного мозга при их очистке, и они составляют очень редкую подгруппу, которая может давать начало эктодермальным, мезодермальным и энтодермальным росткам. В данном обзоре рассматриваются методики выделения МАРС, их плюрипотентные свойства и возможное терапевтическое применение этой популяции клеток, обладающих высокой пластичностью.

В то время как гемопоэтические клетки-предшественники (ГКП) обычно можно отделить от клеток крови и костного мозга, используя поверхностные маркеры клеток и/или точную цитометрию, МАРС выделяют при помощи сложных

протоколов культивирования. После сбора из цельного костного мозга удаляют дифференцированные клетки крови CD45+/GlyA+. Оставшиеся клетки составляют примерно 0,1–0,5% цельного костного мозга. Затем эти клетки подвергают дальнейшей очистке методом культивирования с высокой плотностью с использованием определенных факторов роста и питательной среды для сохранения недифференцированного фенотипа. При флуоресцентной сортировке клеток (FACS) после 15 делений у них обнаруживается отсутствие многих клеточных маркеров, включая маркеры клеток эндотелия, маркеры стволовых клеток, панлейкоцитарный антиген, маркеры HLA и антигены главного комплекса гистосовместимости I класса. Они экспрессируют в небольшом количестве  $\beta$ 2-микроглобулин, антиген CD44 и рецептор VEGF-2, а также в большом количестве CD 13 и VLA-2. Их морфология в значительной степени зависит от используемой питательной среды. При выращивании описанным выше методом клетки имеют крупный размер и содержат вакуоли. Кроме того, они могут сохранять свой фенотип после более чем 50 делений без заметного укорочения теломер. Образующаяся в результате популяция составляет примерно 0,02–0,08% от исходной подгруппы CD45-/GlyA-. Неясно, способствует ли длительное культивирование увеличению количества исходно имевшихся мультипотентных клеток или оно является обязательным условием индукции пластичности в этой исчезающей малой части клеток костного мозга [11].

До недавнего времени МАРС обнаруживали только в постнатальном костном мозге; однако в последних работах было показано, что они обнаруживаются также в головном мозге и мышцах мышей. Эти клетки могут представлять собой МАРС из костного мозга в циркуляции или ткань-специфичные стволовые клетки, обладающие характеристиками МАРС. Для полного понимания сложных биологических процессов, лежащих в основе этого изменения пластичности, потребуются уточнить этот вопрос.

В ранних работах, где описывались человеческие МАРС, было показано, что изменение условий культивирования влияет на фенотип этих клеток, обладающих высокой пластичностью. Человеческие МАРС могут превращаться в клетки различных линий мезодермального роста: остеобласты, хондробласты, адипоциты, клетки стромы, скелетные миофибробласты и эндотелиоциты [9].

В дальнейших исследованиях была установлена способность МАРС превращаться в клетки всех трех зародышевых листков. Было уже известно, что в культуре МАРС могут экспрессировать маркеры и проявлять функциональные свойства эндотелиоцитов. Эта пластичность кажется еще более замечательной, когда было показано, что МАРС могут дифференцироваться с образованием клеток вентральной энтодермы. При культивировании в условиях, обычно используемых для культивирования гепатоцитов, МАРС человека и грызунов приобретают морфологические признаки, поверхностные клеточные маркеры и функциональный фенотип этих клеток. МАРС грызунов также могут выступать предшественниками нейроэктодермы, поскольку при культивировании у МАРС появляются характеристики астроцитов, олигодендроцитов и нейронов. В целом, все большее количество видов клеток, получаемых из МАРС, дает надежду, что их можно будет использовать в терапии заболеваний различных органов [3].

Пластичность МАРСs изучалась на модели с использованием мышей, где меченные МАРСs вводили в раннюю мышечную бластоцисту. Донорские МАРСs получали у трансгенных мышей, экспрессирующих  $\beta$ -галактозидазу ( $\beta$ -gal) во всех клетках. (При контакте с органическим субстратом клетки с экспрессией  $\beta$ -галактозидазы окрашиваются синим цветом, что позволяет легко визуализировать их). Потомство было химерным с генетическим материалом донора и реципиента. После забоя животных через разные промежутки времени экспрессия mRNA  $\beta$ -gal обнаруживалась в различных органах: в мозге, сетчатке, легких, миокарде, скелетных мышцах, печени, кишечнике, почках, селезенке, костном мозге, крови и коже. При иммунофлуоресцентном анализе на маркеры эпителиальных и гемопоэтических клеток было показано, что наличие генетического материала  $\beta$ -gal в печени, легких и желудочно-кишечном тракте не связано с клетками крови. Было показано, что участие МАРСs в органогенезе носит дозозависимый характер, поскольку введение МАРСs в большом количестве приводило к более выраженной экспрессии  $\beta$ -gal, чем введение одной клетки. Наследование донорских генов за счет изменения зародышевой линии не изучалось в этой системе. Хотя образование большого количества тканей из МАРСs документировано, неясно, как этот подход может использоваться в терапевтических целях у человека.

В моделях ксенотенной и аллогенной трансплантации было показано, что МАРСs способны к ткань-специфическому приживлению. Человеческие МАРСs после трансплантации мышам с иммунодефицитом принимают участие в опухолевом ангиогенезе и образовании нативных сосудов, что подтверждается обнаружением человеческого  $\beta$ 2-микроглобулина в мышечном эндотелии. Было проведено исследование, где  $\beta$ -gal+ МАРСs вводили мышам с иммунодефицитом, которым не проводилась миелоабляция. Донорские вносили свой вклад в гемопоэз; при этом образовывались  $\beta$ -gal-экспрессирующие клетки крови. Кроме того, небольшое количество эпителиальных клеток донорского происхождения обнаруживались в печени, легких и кишечнике. В отличие от описанной выше модели, где происходило развитие организма,  $\beta$ -gal+ клетки находили в мозге, сердце и мышцах. Облучение в дозах, слишком низких для индукции повреждения тканей, не способствовало приживлению клеток в каком-либо органе. Представляет интерес изучение того, как индукция апоптоза и некроза тканей влияет на пластичность МАРС [7].

Представленные выше интересные данные не дают ответа на два важных вопроса: о возможности применения этих клеток при заболеваниях у человека и о функциональных преимуществах донорских клеток. После того, как эти аспекты будут документированы, можно предвидеть, по меньшей мере, четыре различных подхода к применению МАРСs. Один из них – это мобилизация нативного костного мозга с использованием факторов роста и цитокинов, действие которых направлено на МАРСs, чтобы привлечь их в нормальную, но поврежденную ткань. В этой модели МАРСs выступают в качестве обновляемого пула предшественников тканевых клеток. В то же время, поскольку факторы, управляющие дифференцировкой и хоумингом МАРСs еще не до конца определены, вероятно, эта цель не будет достигнута еще много лет. В качестве другой системы предлагается прямая имплантация наивных или дифференцированных МАРСs в места повреждения тканей, например, введение через катетер в по-

врежденный миокард или участки нервной системы. Хотя это предложение позволяет обойти проблему хоуминга, по-прежнему остаются открытыми вопросы воздействия микроокружения и относительной труднодоступности некоторых органов. Третий подход к лечению предполагает аллогенную трансплантацию донорских МАРСs реципиентам. Хотя эта идея хороша для использования заболеваний, при которых имеется определенный генетический дефект, при этом пациент подвергается такому же риску инфекции и иммунной реакции, как при трансплантации костного мозга. Наиболее привлекательным подходом может быть манипуляция аутологичным костным мозгом *ex-vivo* с последующей реимплантацией хозяину. Хотя это позволяет обойти много опасностей при трансплантации аутологичного костного мозга, используемые в настоящее время ретровирусные системы трансдукции характеризуются возможностью таких осложнений, как лимфолифферативные заболевания и лейкозы. Таким образом, хотя использование МАРСs в терапии остается многообещающим, до их применения в лечении заболеваний у человека предстоит разрешить еще много вопросов.

Данные о пластичности МАРСs и клеток костного мозга в целом отражают изменение наших представлений об этих клетках. Принятые ранее представления о ремоделировании и регенерации тканей в настоящее время должны быть расширены, чтобы включить в эту концепцию вклад клеток, происходящих из костного мозга. В исследованиях *in-vitro* и *in-vivo* было показано, что МАРСs обладают высокой пластичностью, и эта область исследования представляется очень перспективной в будущем. Эти исследования не будут лишены трудностей, но если у человека удастся так же широко документировать пластичность этих клеток, как у мышей, и если будет показано, что потомство МАРСs обеспечивает улучшение функции, следующим этапом будет внедрение этой терапии в клиническую практику.

#### Трансплантация $\beta$ -клеток поджелудочной железы

Отрицательный социальный эффект сахарного диабета и его осложнений трудно переоценить. По оценкам, в США число больных диабетом составляет 16 миллионов человек, а во всем мире – 200 миллионов. Это третье по распространенности заболевание и четвертая по значимости причина смерти населения в Северной Америке. Медицинские затраты на лечение сахарного диабета в США в 2002 году превысили 110 миллиардов долларов.

Инъекции инсулина остаются ведущим способом лечения пациентов с I типом сахарного диабета (СД I), и в Исследовании контроля диабета и осложнений (Diabetes Control and Complications Trial) было показано, что контроль гликемии позволяет достоверно снизить частоту возникновения ретинопатии, нейропатии и нефропатии. В опубликованных недавно обзорах результатов трансплантации клеток островков поджелудочной железы было показано, что этот метод в тщательно отобранной группе пациентов с СД I позволяет нормализовать гликемию без потребности в проведении инсулинотерапии.

Ballinger и Lacy сообщили о первом успешном случае изотрансплантации  $\beta$ -клеток островков поджелудочной железы в 1972 году в модели с использованием крыс с сахарным диабетом [17]. После этого поступали сообщения об успешной аутоотрансплантации у человека после панкреатэктомии по поводу хронического панкреатита [18]. В то же время, в

целом, общая частота успеха при трансплантации островковых  $\beta$ -клеток до 2000 года составляла менее 10%, несмотря на ряд технических достижений, включая усовершенствование выделения  $\beta$ -клеток островков и методик их очистки [19–22]. Среди этих достижений выделяют использование камеры Рикорди и разработку либертазы, что способствовало обогащению суспензии изолированных клеток панкреатических островков. Усовершенствование методик культивирования [18] позволило дополнительно повысить чистоту получаемой клеточной массы. Другие достижения включали усовершенствование методов транспортировки образцов из одного центра в другой, успешное применение донорства после остановки сердца и разработку перфторуглеродной системы для транспортировки органов с «двуслойной» оксигенацией. В целом эти достижения позволили довести показатель независимости от введения инсулина в течение первого года до 50% [23].

Основное улучшение клинических результатов было достигнуто с разработкой Эдмонтоновского протокола. Основное достижение этого протокола связано с отказом от использования кортикостероидов, которые оказывают неблагоприятное действие на клетки островков поджелудочной железы; для успешной иммуносупрессии используется сиролимус, такролимус в низких дозах и даклизумаб (антитела к рецептору IL-2R), и применяется инфузия по меньшей мере двух свежеприготовленных препаратов клеточной массы островков поджелудочной железы в количестве примерно 13000 эквивалентов островков на килограмм массы тела реципиента. Этот протокол был широко принят и в дальнейшем усовершенствован, особенно с успешным развитием протокола инфузии от одного донора.

Поскольку после трансплантации клеток островков вместо инсулинотерапии применяется иммуносупрессия, которая характеризуется собственными рисками. В большинстве центров трансплантация проводится только пациентам с СД I, характеризующимся очень нестабильным течением, у которых интенсивная инсулинотерапия оказалась неэффективной, а также реципиентам аллотрансплантатов солидных органов, которые уже получают иммуносупрессивную терапию.

В большинстве принятых в настоящее время протоколов для трансплантации используется здоровая поджелудочная железа, которую получают у доноров после гибели мозга или остановки сердца, после чего панкреатическую ткань обрабатывают раствором коллагеназы и проводят очистку островковых  $\beta$ -клеток по градиенту плотности. Проводится количественная и качественная оценка [24] выделенных островковых  $\beta$ -клеток, которые должны соответствовать стандартам качества. Одновременно проводится подготовка пациентов с использованием различных средств индукции толерантности. Инфузия одного или более препаратов островковых  $\beta$ -клеток может проводиться в свежем виде или после культивирования в принятой в центре дозе, которую выражают, как отношение числа эквивалентов островков к массе тела пациента (ЭО/кг). В большинстве центров используется введение через систему воротной вены [25], при котором проводится седация пациентов, чрескожное введение ангиографической канюли в воротную вену, системное введение антикоагулянтов и применяется тщательный контроль давления в портальной системе. В схеме иммуносупрессивной

терапии обычно обходятся без использования кортикостероидов и ингибиторов кальциневрина в связи с их документированным токсическим влиянием на клетки островков поджелудочной железы.

До настоящего времени не было зарегистрировано случаев смерти больных, связанных с трансплантацией. В последующей публикации Эдмонтоновской группы содержатся сведения об осложнениях, последовавших в 54 процедурах, в том числе о кровотечении (пять случаев), частичном тромбозе воротной вены (два случая), потребности в переливании крови (три случая) и развитии нарастающего внутрипеченочного и субкапсулярного кровотечения, потребовавшего переливания крови и хирургического вмешательства (один случай). К остальным зарегистрированным осложнениям относились повышение показателей функциональных проб печени, гиперхолестеринемия, повышение креатинина, ухудшение протеинурии и развитие или ухудшение течения гипертензии. Также были зарегистрированы побочные эффекты медикаментозной терапии, в том числе тяжелое изъязвление полости рта и глотки, потеря веса, анемия, ускорение развития нефропатии. Отдаленные результаты трансплантации островковых  $\beta$ -клеток пока неизвестны [4].

В настоящее время успешность процедуры тесно коррелирует с опытом того учреждения, где она проводится. В рамках недавно начатой программы Национальных институтов здоровья в США годичный показатель независимости от инсулина составил 50%. Для сравнения, годичный показатель независимости от инсулина по данным Эдмонтоновской группы составил примерно 80%, а показатель 3-летнего функционирования трансплантата – 90% по данным публикации 2002 года. В настоящее время проводится многоцентровое исследование трансплантации по Эдмонтоновскому протоколу, чтобы определить возможность воспроизведения их результатов [14].

В связи с большой нехваткой доноров островковых  $\beta$ -клеток в сравнении с потенциальным числом реципиентов в настоящее время проводится крупное исследование для изучения потенциальных суррогатов островковых  $\beta$ -клеток, включая инкапсулированные ксенотрансплантаты, клеточные линии островковых  $\beta$ -клеток человека и эмбриональные стволовые клетки [7].

В результате ряда технических достижений трансплантация  $\beta$ -клеток островков поджелудочной железы в клинической практике стала возможной. Однако в настоящее время об успешном проведении этой процедуры сообщают только крупные центры трансплантации, и для приобретения необходимых технических навыков требуются значительные вложения; метод применяется только в ограниченной группе больных СД I.

Адоптивная иммунотерапия используется в лечении хронических инфекционных или злокачественных процессов. При этом измененные аутологичные клетки используют для стимуляции собственной реактивности организма или для оказания прямого противоопухолевого или цитотоксического действия в организме хозяина [33]. Этот вид терапии основан на предположении, что Т-лимфоциты можно стимулировать к запуску клинически значимого ответа на опухоли или инфекционные агенты. Эта гипотеза подтверждается в моделях с использованием животных и в доклинических исследованиях [13].

Опухоль-специфичная адоптивная Т-клеточная терапия и опухоль-специфичная вакцинация – это два основных подхода к адоптивной иммунотерапии злокачественных опухолей. Для первой требуется экспансия опухоль-специфичных Т-лимфоцитов *ex vivo*, после чего проводится их инфузия пациенту. Второй метод основан на введении модифицированных аутологичных клеток, антигенных белков, пептидов и нуклеиновых кислот опухоли с дендритными клетками (ДК) или генетическим путем с адьювантом или без него.

Использование ДК и антиген-специфичных Т-лимфоцитов представляет собой два примера адоптивной иммунотерапии. В то же время, в обоих случаях проводится выбор тумор-ассоциированных антигенов-мишеней (ТААМ), на которые направлен иммунный ответ. Существует пять основных классов ТААМ: антигены дифференцировки (например, Melan-A/MART-1, gp100 и тирозиназа при меланоме); неоантигены (например, MAGE при меланоме, раке пищевода, легкого, предстательной железы, толстой кишки и молочной железы); мутированные и гиперэкспрессированные антигены (например, p53, ras и HER-2/neu); универсальные антигены (человеческая теломераза, обратная транскриптаза, сурвивин); и вирус-индуцированные антигены (EBV при лимфоме Ходжкина). Получение сильного иммунного ответа на эти антигены – это общая задача терапии с использованием ДК и Т-лимфоцитов [10].

#### Иммунотерапия с использованием дендритных клеток

Дендритные клетки (ДК) – это популяция мононуклеарных клеток (МНК) костномозгового происхождения, которые в «незрелой» форме присутствуют почти во всех тканях организма. ДК выступают в виде профессиональных антиген-презентирующих клеток (АПК) и обладают высокой способностью стимулировать наивные Т-лимфоциты (а также В-лимфоциты, натуральные киллеры и НК-Т клетки), инициируя первичный иммунный ответ. Они проходят сложный процесс «созревания», вступая в контакт с микроорганизмами, их продуктами или «сигналами опасности» от соседних тканей. При этом происходит их миграция в лимфатические узлы, где ДК представляют подготовленный антиген на молекулах МНС и антиген-презентирующих молекулах, таких как CD1, наивным Т- и В-лимфоцитам. Существует несколько подвидов ДК, но в клинических исследованиях основное внимание обращают на два из них: миелоидные ДК (ДК1; CD11c+) и плазмацитоидные ДК (ДК2; CD11c- CD123+).

В значительном количестве клинических исследованиях, в основном, I и II фазы, описывается использование ДК в иммунотерапии злокачественных опухолей (например, неходжкинской лимфомы, меланомы, множественной миеломы, рака предстательной железы, рака почки и молочной железы). В подавляющем большинстве этих исследований использовались миелоидные ДК, происходящие от моноцитов или CD34+ гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП). Антигены доставлялись в различной форме (в виде пептидов, белков, апоптозных клеток, лизата опухолевых клеток, рекомбинантных векторов, сливных ДК и опухолевых клеток). Хотя во многих из этих предварительных исследований были показаны признаки иммуногенности и даже клинического ответа, остается несколько вопросов, на которые ответа не получено, в том числе касающихся оптимальной дозы ДК, оптимального для применения подвида ДК (ДК1 или ДК2; способ селекции), сигнала к созреванию, механизма доставки антигена и пути введения [14].

Недавно был опубликован обзор применения ДК в лечении злокачественных опухолей у первой тысячи пациентов. При этом практически не было выявлено побочных эффектов. Клинический ответ был получен примерно в 50% исследований, хотя его выраженность и определение были различными. Нет сомнения, что иммунотерапия, основанная на применении ДК, безопасна, но ее эффективность в монотерапии ставится под вопрос. Вероятно, мультимодальный подход с использованием иммунотерапии ДК в качестве вспомогательного метода, когда опухолевая нагрузка невелика, окажется более эффективным, чем введение ДК в монотерапии. В настоящее время проводятся несколько клинических исследований с использованием такого подхода.

#### Иммунотерапия с использованием Т-лимфоцитов

Еще один подход к адоптивной иммунотерапии предполагает использование высоких доз Т-лимфоцитов, распознающих антигены, экспрессированные на клетках, пораженных хронической инфекцией, или на злокачественных клетках. Эта концепция успешно применялась в ряде моделей с использованием животных, а также при хроническом миелолейкозе (ХМЛ), где инфузия донорских лейкоцитов (ИДЛ) уже много лет используется для индукции ответа «трансплантат против лейкоза». В качестве источника цитотоксических Т-лимфоцитов могут использоваться как пациенты, так и здоровые доноры (при аллогенной трансплантации стволовых клеток). В использовании Т-лимфоцитов в терапии можно выделить несколько подходов в зависимости от источника лимфоцитов и от тех манипуляций, которыми они подвергаются *ex vivo*. Возможно использование неизмененных аллогенных донорских Т-лимфоцитов, поликлональных Т-лимфоцитов после активации *ex vivo*, аллообедненных Т-лимфоцитов, антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов и трансдуцированных Т-лимфоцитов с химерным рецептором [7].

Применение аутологичных лимфоцитов потенциально может быть полезно для индукции опухоль-специфичного цитотоксического действия без токсических побочных эффектов стандартной химиотерапии или аллогенных Т-лимфоцитов (например, реакции трансплантат против хозяина). В то же время, существуют потенциальные побочные эффекты использования аутологичных лимфоцитов, такие как синдром лизиса опухоли, который может привести к внезапной сердечной смерти или почечной недостаточности, неконтролируемый выброс цитокинов, ведущий к шоку, и аутоиммунные реакции, включая аплазию и иммунодефициты. Некоторые из этих проблем можно преодолеть, используя генетически модифицированные лимфоциты с введенным «геном суицида», который обычно получают из гена тимидинкиназы вируса простого герпеса. Такие клетки можно уничтожить введением ганцикловира, если побочные эффекты перевесят пользу от вмешательства [11].

Аутологичные лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (ЛИО) – это еще один источник цитотоксических Т-лимфоцитов. В опубликованном исследовании ЛИО, полученные от пациента с метастазирующей меланомой, были введены пациенту после экспансии и лечения флударабином и циклофосфамидом в дозах, снижающих уровень лимфоцитов. IL-2 вводили для усиления пролиферации *in-vivo*. У двоих пациентов был показано полный ответ опухоли и доминирование введенных ЛИО среди лимфоцитов. Это исследование показало, что снижение уровня лимфоцитов *in-vivo* играет важ-



ную роль и может быть ключом к успеху в обеспечении экспансии опухоль-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов *in vivo* [12].

Адоптивная иммунотерапия – это быстрорастущая область, которая находит применение в лечении злокачественных опухолей, трансплантации костного мозга, терапии инфекционных и аутоиммунных заболеваний.

### *Литература*

1. Phillips K., Gentry T., McCowage G. et al. Cell-surface markers for assessing gene transfer into human hematopoietic cells // *Nat. Med.* – 1996, № 2. – P.1154–6.
2. Williams D.A. Expression of introduced genetic sequences in hematopoietic cells following retroviral-mediated gene transfer // *Hum. Gene. Ther.* – 1990, № 1. – P.229–39.
3. Karlsson S. Treatment of genetic defects in hematopoietic cell function by gene transfer // *Blood.* – 1991, № 78. – P.2481–92.
4. Dao M., Hannum C., Kohn D. et al. FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after *ex vivo* retroviral-mediated transduction // *Blood.* – 1997, № 89. – P.446–56.
5. Donahue R.E., Kessler S.W., Bodine D. et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transferr // *J. Exp. Med.* – 1992, № 176. – P.1125–35.
6. Chatterjee S., Lu D., Podsakoff G. et al. Strategies for efficient gene transfer into hematopoietic cells: The use of adeno-associated virus vectors in gene therapy // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1995, № 770. – P.79–90.
7. Chen L., Pulsipher M., Chen D. et al. Selective transgene expression for detection and elimination of contaminating carcinoma cells in hematopoietic stem cell sources // *J. Clin. Invest.* – 1996, № 98. – P.2539–48.
8. Huang S., Kamata T., Takada Y. et al. Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells // *J. Virol.* – 1996, № 70 (7). – P.4502–8.
9. Neering S.J., Hardy S.F., Minamoto D. et al. Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors // *Blood.* – 1996, № 88. – P.1147–55.
10. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector // *Science.* – 1999, № 286. – P.2244–5.
11. Pereira R.F., Halford K.W., O'Hara M.D. et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1995, № 92. – P.4857–61.
12. Pittinger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* – 1999, № 284. – P.143–7.
13. Allay J.A., Dennis J.E., Haynesworth S.E. et al. LacZ and interleukin-3 expression *in vivo* after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors // *Hum. Gene Ther.* – 1997, № 8. – P.1417–27.
14. Marx J.C., Allay J.A., Persons D.A. et al. High-efficiency transduction and long-term gene expression with a murine stem cell retroviral vector encoding the green fluorescent protein in human marrow stromal cells // *Hum Gene Ther.* – 1999, № 10. – P.1163–73.