

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК CD4+CD25+ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В ПОДАВЛЕНИИ РЕАКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА

И.А. Корсунский¹, А.Г. Румянцев¹, С.Н. Быковская²

¹ФГУ ФНКЦ детской гематологии, онкологии и гематологии Росздрава;

²Лаборатория клеточного мониторинга, Москва

Реакция трансплантат против хозяина (РТПХ) — одно из самых тяжелых осложнений, возникающих после пересадки клеток аллогенного костного мозга. Изучение иммунных механизмов развития острой РТПХ выявило критическую роль регуляторных Т-клеток CD4+CD25+Foxp3+, ответственных за подавление функции эффекторных механизмов отторжения, включая ингибирование цитотоксических Т-лимфоцитов CD8+, Т-хелперов CD4+CD25, естественных киллеров и других клеток, направленных на повреждение клеток хозяина. В экспериментах на животных показана ведущая роль Т-регуляторов в инициации РТПХ. В ряде исследований у человека проанализирована корреляция между содержанием Т-рег CD4+CD25+Foxp3+ в трансплантате и/или крови реципиента и последующим развитием острой или хронической РТПХ. Тяжесть аллогенной РТПХ обратно пропорциональна низкой экспрессии Foxp3.

Помимо регуляторных Т-клеток, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают выраженным иммуносупрессивным эффектом, который продемонстрирован в экспериментах на животных и при клинических испытаниях у больных. МСК не только предотвращают развитие РТПХ, но и могут быть использованы для лечения уже начавшегося процесса. По мнению ряда авторов, МСК предотвращают развитие РТПХ, оказывая непосредственное влияние на индукцию регуляторных Т-клеток *in vivo*.

Ключевые слова: реакция трансплантат против хозяина, мезенхимальные стволовые клетки, регуляторные Т-клетки

ROLE OF THE REGULATORY T CELLS CD4+CD25+ AND MESENCHYMAL MARROW STEM CELLS IN SUPPRESSING A GRAFT VERSUS HOST DISEASE

I.A. Korsunsky¹, A.G. Rumyantsev¹, S.N. Bykovskaya²

¹Federal Research Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology

and Immunology, Russian Agency for Health Care; ²Laboratory of Cell Monitoring, Moscow

A graft versus host disease (GVHD) is one of the most serious complications occurring after allogeneic marrow cell transplantation. The investigation of the immune mechanisms responsible for the development of an acute GVHD has revealed a critical role of the regulatory T cells CD4+CD25+Foxp3+ that are responsible for the suppression of the function of effector rejection mechanisms, including the inhibition of the cytotoxic T lymphocytes CD8+, T-helper cells CD4+CD25, natural killer cells and others that damage the host cells. Animal experiments have indicated the leading role of regulatory T cells in the initiation of GVHD. A number of human studies have analysed a correlation between the levels of the regulatory T cells CD4+CD25+Foxp3+ in the graft and/or blood of a recipient and the further occurrence of acute or chronic GVHD. The severity of an allogeneic GVHD is inversely related to the low expression of Foxp3.

Besides regulatory T cells, mesenchymal stem cells (MSCs) have a significant immunosuppressive effect that has been demonstrated in the animal experiments and in the clinical trials in patients. MSCs do not only prevent the development of a GVHD, but may be used for the treatment of a just incipient process. In the opinion of a number of authors, MSCs prevent the development of a GVHD by directly affecting the induction of regulatory T cells *in vivo*.

Key words: graft versus host reaction, mesenchymal stem cells, regulatory T cells

Введение

Реакция трансплантат против хозяина (РТПХ) инициируется после пересадки клеток аллогенного костного мозга (КМ), когда пересаженные клетки здорового донора распознают антигенные детерминанты на антигенпрезентирующих клетках (АПК) реципиента [1]. Т-лимфоциты донора, специфически активированные клетками хозяина, пролиферируют, секретируют каскад цитокинов (так называемый цитокиновый шторм) и дифференцируются в эффекторные Т-клетки, которые обычно атакуют кожу, печень и гастроинтестинальный тракт реципиента.

В клинике наблюдается два вида аллореактивности. Наиболее часто встречающийся тип — РТПХ, вызываемая главным образом Т-лимфоцитами, находящимися в трансплантате КМ донора, хотя иногда трансплантат может страдать от иммунной системы хозяина. Полное удаление Т-клеток из трансплантата должно было бы предотвратить развитие РТПХ, одна-

ко именно Т-клетки ответственны за окончательное уничтожение лейкозных клеток — реакция трансплантат против лейкоза (РТПЛ). Когда аутореактивность редуцирована или отсутствует, например, при ауто-трансплантации, пересадке КМ от однояйцового близнеца или если Т-клетки полностью удалены из трансплантата, возрастает вероятность рецидива онкологического заболевания. Таким образом, задача заключается в том, чтобы получить РТПЛ, но избежать развития РТПХ.

Острая и хроническая РТПХ. В клинике различают острую и хроническую РТПХ. Ранние признаки острой РТПХ проявляются экспансией CD8+ Т-лимфоцитов донора и повышенной продукцией интерферона γ (ИФНγ) Т-клетками донора CD8+ и CD4+. Острая РТПХ развивается в результате атаки клеток реципиента цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами донора, сопровождается элиминацией лимфоцитов реципиента и тяжелым иммунодефицитом [2].

При условиях, когда активность CD8⁺ Т-клеток донора подавлена, острая РТПХ превращается в хроническую [3]. При хронической РТПХ Т-лимфоциты CD8⁺ приживаются в организме реципиента, но не проявляют цитотоксичности против клеток хозяина. CD8⁺ Т-лимфоциты донора разрушаются, а оставшиеся клетки, резистентные к апоптозу, становятся анергичными [4].

Изучение влияния регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ (Трег) донора на поведение CD8⁺ Т-лимфоцитов показало, что именно Трег CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ могут блокировать активацию донорских CD8⁺ Т-клеток и, следовательно, препятствовать этой субпопуляции Т-лимфоцитов индуцировать острую РТПХ [4]. Напротив, в хронической РТПХ происходит активация CD4⁺ донорских Т-клеток, которые стимулируют субпопуляцию аутореактивных В-лимфоцитов реципиента, что приводит к нарушению аутоотолерантности.

Обычно для того чтобы добиться приживания клеток донора и избежать развития РТПХ, проводится химио- и иммуносупрессивная терапия. Однако применение иммуносупрессантов и миелоаблативной терапии сопряжено с глобальной депрессией иммунной системы, повышенной склонностью больного к инфекции и неоплазии, т.е. с резким ухудшением качества жизни. Специфические методы терапии РТПХ смогли бы разрешить одну из самых серьезных проблем трансплантологии. Достижения в изучении супрессорной функции Т-клеток и возможности их применения в клинике открывают перспективы для решения этой задачи.

Регуляторные Т-клетки с супрессорной функцией. В пределах субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов различают 2 типа клеток, обладающих супрессорной активностью. Это клетки, которые не имеют классического фенотипа регуляторных Т-клеток, так называемые индуцированные CD4⁺ Т-клетки и натуральные регуляторные Т-клетки с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Индуцированные Т-клетки получили название Т-регуляторы 1-го класса Трег 1 (Tr1) и Т-хелперы 3-го класса (Th3). Эти клетки приобретают супрессорную активность под действием уникальных условий стимуляции как следствие активации *in vivo* или *in vitro* и могут быть выявлены только на основе их цитокинового профиля. Клетки Tr1 ингибируют ответ Т-хелперов 1-го и 2-го класса — Th1 и Th2 посредством интерлейкин (ИЛ)-10-зависимого механизма [5]. Клетки Th3 секретируют трансформирующий фактор роста β₁ (ТФРβ₁), обладающий супрессорной активностью, и в меньшей степени супрессорные цитокины ИЛ-4 и ИЛ-10.

Есть еще несколько незначительных субпопуляций клеток с супрессорной активностью. К ним относят Т-клетки с маркерами CD8⁺CD28⁻, так называемые двойные негативные Т-клетки (Т-клеточный рецептор — ТКР⁺) CD4⁻CD8⁻, а также натуральные киллерные Т-клетки (НКТ) [5].

Натуральные регуляторные Т-клетки CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Трег) созревают в тимусе и расселяются в периферические лимфоидные органы в течение первых 3—5 дней неонатального развития. У мышей, подвергнутых тимэктомии на 3-й день после рождения, отсутствуют Трег, в результате чего развивается полиауто-

иммунный синдром, который включает аутоиммунный гастрит, оофорит, тиреоидит, орхит [6]. Инфузия клеток CD4⁺CD25⁺, взятых у нормальных мышей, отменяет аутоиммунные проявления у животных, тимэктомированных на 3-й день после рождения. Трег играют критическую роль в подавлении периферической аутореактивности и обеспечивают толерантность к аутоантигенам. Трег CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ имеют пивотальное значение, контролируя аутоиммунитет, аллергию и трансплантационную толерантность [7].

Трег предотвращают не только аутоиммунные расстройства, например, Трег матери подавляют иммунный ответ против клеток плода, контролируют иммунный ответ против вирусов, паразитов, бактерий и дрожжей [8]. Наконец, Трег строго ингибируют противоопухолевый иммунитет. Количественный и/или качественный дефект Трег наблюдается при аутоиммунных заболеваниях, в частности при ревматоидном артрите, множественном склерозе и системной красной волчанке [9].

По данным S. Sakaguchi и соавт. (1995), в норме Т-лимфоциты CD4⁺CD25⁺ составляют 5—10% от общего числа CD4⁺ Т-клеток в тимусе, периферической крови (ПК) и лимфоидных тканях. Уникальными маркерами натуральных Трег являются постоянная экспрессия α-цепи рецептора к ИЛ-2 (CD25^{hi}) и внутриядерного фактора транскрипции Foxp3, который контролирует развитие и функцию этих клеток [5].

Так как обычные CD4⁺CD25⁻ Т-клетки могут транзиторно экспрессировать CD25⁺ при активации, эта поверхностная молекула не может рассматриваться как эксклюзивный маркер Трег. Характерным признаком Трег является высокий уровень экспрессии α-цепи рецептора к ИЛ-2, (CD25^{hi}). Впоследствии на основе уровня экспрессии CD25⁺ были идентифицированы 4 субпопуляции клеток: CD25⁻, CD25⁺, CD25⁺⁺ и CD25⁺⁺⁺. Интенсивность экспрессии CD25 соответствовала экспрессии Foxp3 и иммуносупрессорной функции этих клеток [10]. Пропорция таких клеток ниже и по нашим данным и по результатам других авторов в норме составляет 2,6—5,2 % [11].

До настоящего времени наилучший маркер Трег — коэкспрессия CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Кроме того, на Трег выявляются рецептор глюкокортикоид-индуцированного фактора некроза опухоли (pФНО, GITR), антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ-4), хоминг-рецепторы лимфоцитов (CD103, CD62L CCR5) [12] и другие маркеры.

Трег имеют поликлональный репертуар ТКР, основанный на разнообразии экспрессии генов различных элементов ТКР — α/β и могут распознавать широкий спектр своих и чужих антигенов [12].

Свежевыделенные Трег анергичны и не могут отвечать на стимуляцию ТКР. Показано, что Трег способны пролиферировать в ответ на стимулирующие антигены только в присутствии ИЛ-2 и при активации подавляют пролиферацию как наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, так и эффекторных Т-клеток CD4⁺ CD25⁻, цитотоксических CD8⁺ Т-клеток памяти, а также клеток — натуральных киллеров — НК и В-лимфоцитов через контактзависимый механизм [5]. Как было показано ранее, ингибиторный эффект Трег может быть опосредован иммуносупрессивными цитокинами ИЛ-10 и связанным с мембра-

ной ТФРβ. Однако экспрессия GITR, ЦТЛ-4, активация гранзима В, перфоринзависимый цитотоксический механизм, выявленные в Трег, свидетельствуют о возможности реализации разных путей цитотоксического эффекта ТРК [12].

Иммунная толерантность, которая развивается у реципиента аллогенного КМ, антиген-специфична и может быть адоптивно перенесена нативным мышам-реципиентам. У тимэктомированных животных толерантность донора к хозяину, опосредованная регуляторными Т-клетками, не развивается [5]. Эти данные указывают на критическую важность тимуса для развития *de novo* Трег клеток после аллогенной пересадки КМ. Более того, поддержание толерантности Трег донора к клеткам реципиента зависит от постоянного присутствия антигенов главного комплекса гистосовместимости 2-го класса (ГКГ II) у реципиента. Экспрессия молекул ГКГ II критична для генерации клеток CD4+CD25+ с регуляторным потенциалом. Развитие способности этих клеток контролировать ответ на аллоантигены, по-видимому, требует антигенного сигнала [12]. Субпопуляции АПК обеспечивают специфические сигналы, стимулирующие активацию и созревание Трег клеток.

Присутствие аутореактивных лимфоцитов или аутоантигена на АПК индуцирует динамические изменения в функциональном поведении периферической регуляторной системы, включая активацию антиген-специфических регуляторных клеток CD4+CD25+Foxp3. Индуцированные в присутствии аутореактивных Т-клеток, Трег приобретают способность подавлять адоптивный перенос аутологичной РТПХ независимо от присутствия CD8+ Т-клеток, причем и антиген-специфические регуляторные Т-клетки, и патогенные эффекторные Т-клетки в аутологичной РТПХ распознают общий пептидный антиген, презентируемый молекулами ГКГ II. Тем не менее протекция от РТПХ, осуществляемая Трег, специфичными к антигенам хозяина, не является необходимой, так как, будучи однажды активированы, Трег могут ингибировать эффекторные Т-клетки антиген-независимым образом [13].

Регуляторный контроль ответа на РТПХ опосредуется и аутореактивными, и аллореактивными Т-клетками в комплексе. Несмотря на то, что в этом процессе принимают участие разные популяции клеток, натуральные регуляторные клетки CD4+CD25+ жизненно необходимы [13]. Более того, контроль РТПХ, осуществляемый Трег, сопоставим с антилейкемическим эффектом, направленным против клеток опухоли.

Роль регуляторных Т-клеток CD4+CD25+Foxp3 в развитии РТПХ. Большинство тяжелых иммунологических осложнений, возникающих вследствие трансплантации аллогенного КМ, вызвано лимфоцитами донора, контаминирующими трансплантат. Именно Т-клетки вызывают развитие РТПХ. Однако деплеция Т-клеток в трансплантате с целью избежать РТПХ приводит к увеличению частоты рецидивов, отторжению трансплантата и возникновению инфекционных осложнений. Как упоминалось выше, Трег представляют субпопуляцию Т-клеток, обладающих супрессорной активностью и ответственных за создание иммунологической толерантности. При удалении регуляторных Т-клеток из трансплантата КМ перед инъекцией реци-

пиенту развивалась летальная РТПХ. Именно эти эксперименты впервые доказали, что Т-регуляторные лимфоциты ответственны за подавление РТПХ [5]. Последующие опыты на мышах подтвердили, что Трег играют критическую роль в развитии этого заболевания. Когда Трег, естественно присутствующие в трансплантате аллогенного КМ, удаляли перед инфузией облученным мышам-реципиентам, развитие РТПХ значительно ускорялось. Деплеция (истощение) CD25+ в трансплантированных клетках КМ донора ускоряла развитие острой РТПХ. Более того, инфузия активированных *ex vivo* и выращенных Т-клеток донора CD4+CD25+ останавливала развитие острой РТПХ после пересадки клеток КМ дозозависимым способом [14]. Более того, добавление большого числа свежесделанных Трег в суспензию клеток КМ донора, содержащую аллореактивные Т-лимфоциты, эффективно предотвращало развитие РТПХ у летально облученных мышей реципиентов [14].

Введение Трег, специфичных к аллоантигенам хозяина, не только предотвращало развитие РТПХ, но также способствовало иммунной реконституции у мышей [15]. Это наблюдение означает, что Трег, специфичные к аллоантигенам хозяина, преимущественно подавляют экспансию Т-клеток, ответственных за РТПХ, сохраняя дифференцировку неаллореактивных Т-клеток.

Аккумуляция Т-клеток донора в период приживления первично происходит в лимфоидных органах, затем Т-клетки рекрутируются в паренхиматозные ткани, такие как желудочно-кишечный тракт, печень, легкие и кожа [16]. В связи с этим, как было показано, значительную роль играет хемокиновый рецептор Трег CCR5, так как он критичен для «хоминга» Трег в пораженные ткани и подавляет их воспаление [14].

Трег клетки реципиента также принимают участие в развитии РТПХ. У мышей-реципиентов, у которых посредством облучения были убиты все Т-клетки, развивалась ускоренная и более тяжелая РТПХ. Однако усиление тяжести РТПХ происходит не из-за отсутствия вообще Т-клеток, а из-за дефицита Т-клеток CD4+CD25+, так как введение Трег клеток реципиента приводит к излечению от РТПХ. Эти данные означают, что Т-клетки реципиента действуют не посредством активности трансплантат против хозяина или подавления гомеостатической пролиферации, а через регуляторный механизм. У реципиентов, у которых отсутствуют почти все Т-лимфоциты, регуляторные Т-клетки реципиента, выжившие после радиации, предшествующей трансплантации КМ донора, замедляют развитие РТПХ [17].

Число Трег CD4+CD25+Foxp3+ снижено при РТПХ у человека. В ряде исследований проанализирована корреляция между содержанием Трег CD4+CD25+Foxp3+ в трансплантате и/или крови реципиента и последующим появлением острой или хронической РТПХ [15, 18–26].

Изучение экспрессии Foxp3 и CTLA-4 в мононуклеарных клетках ПК показало, что тяжесть аллогенной РТПХ обратимо коррелирует с низкой экспрессией Foxp3 [20]. Многократные измерения содержания Трег в ПК 29 больных в течение первых 71–373 дней после трансплантации показали, что начальная фаза

РТПХ сопровождается значительной редукцией Трег в ПК, тогда как на поздних стадиях на фоне интенсивной иммуносупрессивной терапии число Трег возрастает [27].

Чтобы оценить значение количества Трег в трансплантате HLA-совместимых родственников, D. Wolf и соавт. [28] проанализировали 58 образцов КМ и клинические последствия пересадки стволовых клеток. Содержание Трег в трансплантате строго коррелировало с появлением РТПХ. У больных, которым после миелоаблятивной терапии вводили трансплантат с низким содержанием Трег, острая РТПХ развивалась в 76% случаев, тогда как при пересадке трансплантата с высоким содержанием Трег острая РТПХ наблюдалась только у 26% больных.

К. Razvani и соавт. [25] выявили обратную зависимость между абсолютным числом Трег в трансплантате и появлением острой РТПХ. Авторы исследовали фенотип клеток КМ и клеток мобилизованной крови донора, оценивая клетки CD4+Foxp3+ в соответствии с появлением РТПХ у 32 реципиентов HLA-совместимых родственников. Авторы показали, что у пациентов, которым трансплантировали стволовые клетки с низким абсолютным количеством CD4+Foxp3+, отмечен более высокий риск развития РТПХ. У больных с РТПХ зафиксировано небольшое содержание клеток CD4+Foxp3+, а увеличение их числа ассоциируется с низкой частотой возникновения острой РТПХ. Авторы считают, что количество клеток CD4+Foxp3+ среди Т-лимфоцитов донора может быть показателем развития РТПХ у реципиента после пересадки HLA-совместимого КМ.

По данным Z. Zhai и соавт. [29], оценка корреляции между содержанием CD4+CD25^{hi} Т-клеток у больных и доноров КМ в соответствии с прогнозом и появлением РТПХ выявила, что у реципиентов с нормальным или высоким числом клеток CD4+CD25^{hi} РТПХ не развивалась или была умеренной (I стадия) и все больные выжили. Напротив, у реципиентов с низким содержанием Трег или тех, у кого клетки CD4+CD25^{hi} не выявлялись, развивалась тяжелая стадия заболевания (выше II стадии) и все больные умерли в течение 1 года после трансплантации. Отмечено, что количество клеток у реципиента коррелировало с числом клеток у соответствующего донора. Т-клетки CD4+CD25^{hi} реципиента и соответствующего донора экспрессировали высокие уровни Foxp3 и эффективно подавляли пролиферацию отвечающих клеток в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ), что свидетельствует о нормальной функции Трег у таких больных.

Эти результаты соответствуют исследованиям, проведенным на мышах, где было показано, что сниженное число Трег в трансплантате ускоряет развитие РТПХ [14].

Однако изучение CD4+CD25+ Трег клеток ПК больных с хронической РТПХ по крайней мере через 100 дней после пересадки КМ выявило заметно повышенное содержание Трег по сравнению с контрольной группой и больными, у которых РТПХ не развивалась [18]. Эти данные согласуются с пониманием механизмов возникновения хронической РТПХ, при которой пролиферируют эффекторные CD4+ и регуляторные CD4+CD25^{hi} Т-клетки [30].

Представленные выше результаты получены при изучении клеток ПК реципиентов или трансплантата КМ донора. В связи с этим представляет особый интерес работа, в которой проведена идентификация Трег в пораженной слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта больных. К. Rieger и соавт. [24] проанализировали иммуногистохимически соотношение Foxp3+/CD8+ Т-клеток у больных с острой и хронической РТПХ по сравнению с группой здоровых доноров и изменениями, вызванными инфекционным воспалением. Результаты показали, что у больных с колитом, вызванным цитомегаловирусной инфекцией, выявлено увеличение количества CD8+ и регуляторных Foxp3+ Т-клеток; в слизистой оболочке кишечника пациентов с гистологическими признаками РТПХ соотношение Т-клеток Foxp3+/CD8+ снижено до $0,8 \pm 0,1$, тогда как в образцах слизистой оболочки без РТПХ или в контрольных группах соотношение соответствует норме (Foxp3+/CD8+ равно $1,9 \pm 0,1$). При использовании двойной иммуноферментной метки у больных с острой и хронической РТПХ, а также у здоровых доноров наблюдалось незначительное число клеток Foxp3+ и CD3+, тогда как в образцах слизистой больных без РТПХ обнаружено высокое содержание клеток CD3+, экспрессирующих Foxp3+.

Изложенные выше результаты позволяют заключить, что в будущем Трег могут быть использованы в терапевтических целях и для лечения, и для предотвращения РТПХ. В многочисленных исследованиях продемонстрировано, что Трег донора, выращенные *ex vivo*, успешно подавляют развитие РТПХ [14].

Культивирование Т-регуляторов *ex vivo*. Существует несколько способов стимуляции Трег клеток, при которых они могут быть выращены в больших количествах в течение 2—3 нед. Выращенные *ex vivo* клетки сохраняют экспрессию основных клеточных маркеров, включая CD25, CD62L, HLA-DR (у человека), ЦТЛ-4, GITR, и, что самое важное, внутриклеточную экспрессию Foxp3. Эти клетки секретируют ИЛ-10, ТФРβ и сохраняют регуляторную функцию подавления пролиферации и секреции цитокинов отвечающими эффекторными клетками в СКЛ [31].

Трег донора можно индуцировать *ex vivo* или аллогенными АПК реципиента в сочетании с ИЛ-2, или антителами, специфичными к CD3 и /или CD28 в присутствии высоких концентраций ИЛ-2. Используя эти протоколы, авторы получили высокую экспансию Трег [14, 32]. Интересно, что Трег, стимулированные *in vitro* клетками реципиента, эффективнее ингибировали РТПХ, чем клетки, индуцированные посторонними АПК. Более того, Трег, специфичные к аллоантигенам реципиента, *in vivo* выживали лучше, чем Трег, специфичные к посторонним аллоантигенам. В качестве АПК могут быть использованы аллогенные моноклеарные клетки крови или селезенки, однако аллогенные дендритные клетки наиболее эффективны для индукции Трег CD4+CD25+Foxp3+. Полученные таким образом антиген-специфические Трег в 10 раз более эффективно подавляют пролиферацию лимфоцитов оригинального стимулирующего штамма, чем клеток мышей посторонней линии.

По нашим данным, Трег можно успешно индуцировать *ex vivo* в присутствии вышеуказанных факторов;

полученные клетки полностью идентичны нативным Трег по фенотипическим и функциональным характеристикам: в тестах *in vitro* они ингибируют пролиферацию эффекторных клеток в той же степени, что и Трег, выделенные из крови больных или доноров.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были впервые выявлены А.Я. Фриденштейном и соавт. в 1970 г. [30] и позднее описаны другими авторами, которые показали, что одна мезенхимальная клетка способна *in vivo* формировать кость, хрящ и другие мезенхимальные ткани. Далее, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* была продемонстрирована дифференцировка МСК человека в остеобласты, хондроциты, адипоциты, мышцу, предшественники нейрональной ткани, кардиомиоциты. Более того, МСК секретируют цитокины и ростовые факторы, которые способствуют активации эндогенных стволовых клеток. МСК являются компонентом стромы КМ, которая поддерживает гемопоэз, обеспечивая стволовые клетки — предшественники гемопоэтического ряда соответствующими цитокинами и ростовыми факторами. МСК также влияют на «хоминг» и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток КМ [33]. МСК способны мигрировать из КМ в поврежденный орган в случае травмы, ожога или инфекции для репарации тканей и восстановления функции больного органа. МСК участвуют в регенерации миокарда, поврежденной кости, сухожилия, хряща, мениска.

Иммуномодуляторные свойства МСК. Эти клетки ингибируют функцию зрелых Т-лимфоцитов после их клеточной или неспецифической митогенной стимуляции. Выделенные из КМ МСК подавляют пролиферацию не только CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, но и НК, индуцируют блокировку Т-клеток в стадии митоза, модулируют В-клетки, ингибируют дифференцировку моноцитов в дендритные клетки, их созревание и функцию, снижают продукцию воспалительных цитокинов различными популяциями иммунных клеток [26]. Также МСК индуцируют апоптоз CD8⁺ Т-лимфоцитов и экспансию регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ [34].

Ранее было высказано предположение, что растворимые факторы, продуцируемые МСК, представляют ключевые медиаторы ингибирования, хотя клеточный контакт также может играть определенную роль. При кокультивировании с НК-клетками МСК индуцируют в них снижение секреции ИФН γ , резко подавляют индуцированную ИЛ-2 пролиферацию покоящихся, но не активированных НК-клеток, при низких соотношениях МСК/НК изменяют фенотип и подавляют в НК-клетках пролиферацию, секрецию цитокинов и цитотоксичность против клеток мишеней, экспрессирующих антигены гистосовместимости I-го класса (ГКГ I). Интересно, что сами МСК чувствительны к лизису активированными ИЛ-2 (но не свежевыделенными) НК-клетками [35].

Механизмы, которые лежат в основе иммуносупрессивной активности МСК, имеют только частичное объяснение. МСК экспрессируют низкий уровень молекул ГКГ I, но не экспрессируют ГКГ II, костимуляторные молекулы CD80, CD86, CD40 или CD40L. Недавно была выявлена иммуносупрессивная роль локуса гистосовместимости HLA-G, обнаруженного на МСК.

HLA-G — неклассический комплекс гистосовместимости ГКГ I класса, который экспрессируется в мембраносвязанной и растворимой форме. Молекулы HLA-G были впервые идентифицированы в цитотрофобластах, где они играют ключевую роль в создании толерантности матери к плоду. Антигены HLA-G экспрессируются в 7 различных изоформах, включая 4 мембраносвязанных (HLA-G1 — HLA-G4) и 3 растворимых (HLA-G5—G7). Обе изоформы HLA-G проявляют толерогенные свойства, взаимодействуя с ингибиторными рецепторами на дендритных клетках, Т-лимфоцитах и НК, вызывают апоптоз CD8⁺ Т-клеток, подавляют пролиферацию CD4⁺, цитотоксические функции Т- и НК-клеток, созревание дендритных клеток и индуцируют секрецию Th2 цитокинов [36].

Иммуносупрессивный эффект МСК может быть опосредован растворимыми факторами, такими как ТФР β , фактор роста гепатоцитов, ИЛ-10, простагландин E2, индолеамин 2,3-диоксигеназа. Перечисленные выше факторы наряду с прямым иммуносупрессивным эффектом влияют на индукцию регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ [37].

Введение МСК животным и человеку. Иммуносупрессивные свойства МСК делают их привлекательным средством для подавления реакции отторжения трансплантата и предотвращения или лечения РТПХ. Эффективность применения МСК *in vivo* изучалась в моделях на животных [38, 39] и при клинических испытаниях у больных с РТПХ [40, 41].

Например, в экспериментах на крысах показано ингибирование летальной РТПХ при котрансплантации МСК и гемопоэтических стволовых клеток КМ. По сравнению с группой контрольных животных у крыс, которым ввели МСК, нормализовалось число Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ и снизилось соотношение субклассов Th1/Th2, в то же время пропорция регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ повысилась и в селезенке, и в тимусе. По мнению авторов, МСК предотвращают развитие РТПХ, оказывая непосредственное влияние на субпопуляции Т-клеток *in vivo* [39].

В экспериментах V. Tisato и соавт. [38] протестирована способность МСК, выращенных из клеток крови пупочной вены человека, подавлять РТПХ у сублетально облученных иммунодефицитных NOD/SCID мышей, которым вводили моноклеарные клетки ПК человека. Авторы выявили, что РТПХ не развивалась у мышей, которым вводили МСК с еженедельными интервалами, тогда как однократная инъекция МСК была неэффективна.

Однако в ряде экспериментов показано, что, несмотря на то что МСК подавляют пролиферацию аллогенных Т-клеток *in vitro*, независимо от гаплотипа большого комплекса гистосовместимости (ГКГ II), эти клетки не влияют на появление или тяжесть РТПХ *in vivo*. Более того, в описываемых экспериментах тяжесть гистологических изменений в толстой кишке мышей, которым вводили МСК, была идентична изменениям, наблюдаемым у животных контрольной группы. Введение мышам Т-клеток донора, меченных прижизненным красителем CFSE (сукцинимидный эфир карбоксифлуоресцеина), одновременно с МСК показало, что в присутствии МСК эти клетки делятся с такой же интенсивностью, как и Т-клетки контрольной группы, которым МСК не вводили [42].

Интересно, что котрансплантация МСК реципиента и аллогенного КМ донора подавляла отторжение клеток КМ донора у сублетально облученных мышей реципиентов, и напротив, котрансплантация аллогенного КМ и МСК донора значительно снижала приживление клеток КМ. Кроме того, введение аллогенных МСК приводит к развитию клеточного иммунного ответа. Эти результаты показывают, что в сущности МСК не являются иммунопривилегированными клетками и могут индуцировать иммунный ответ *in vivo*, который приводит к отторжению трансплантата [43].

Первый опыт использования аутологичных МСК у человека с целью предотвращения развития РТПХ был предпринят S. Lee и соавт. [44], которые наблюдали ускоренную иммунную реконституцию и повышенную приживляемость и подавление РТПХ после трансплантации несовместимых по HLA-гаплотипу клеток КМ.

Клиническая эффективность МСК, полученных от донора КМ, ассоциировалась со значительной редукцией неприживления трансплантата. МСК донора, котрансплантированные 14 детям с клетками CD34+ от HLA-гаплонесовместимых доноров, индуцировали стойкое приживление гемопоэтических клеток, тогда как в контрольной группе выявлялось 15% больных с неприживлением [45]. Эти результаты согласуются с сообщением K. Le Blanc и соавт. [46], которые использовали гаплоидентичные МСК для котрансплантации с гемопоэтическими стволовыми клетками, что привело к 100% донорскому химеризму и ускоренному приживлению трансплантата.

МСК не только предотвращали развитие РТПХ, но и были использованы для лечения уже начавшегося процесса. Больным вводили МСК от HLA-идентичных

родственников, гаплоидентичных доноров членов семьи или несовместимых доноров 8 пациентам со стероид-рефрактерной III—IV стадией РТПХ и 1 больному с хронической РТПХ. После введения МСК острая РТПХ исчезла полностью у 6 из 8 больных, полное разрешение наблюдалось в кишечнике 6 пациентов. Выживаемость этих больных была значительно лучше, чем у 16 стероид-резистентных пациентов с подтвержденной формой гастроинтестинальной РТПХ, не леченных МСК. У 1 больного с хронической РТПХ наблюдался транзиторный ответ, он умер от посттрансплантационного лимфопролиферативного синдрома, вызванного вирусом Эпштейна—Барр (лимфома).

Благоприятные результаты пилотных испытаний введения МСК для лечения или предотвращения развития РТПХ омрачаются повышенным числом рецидивов у этих больных. H. Ning и соавт. [47] провели рандомизированное исследование, куда включили 30 больных, получивших гемопоэтические стволовые клетки КМ от HLA-идентичных родственников вместе с МСК или без них, выделенных от того же донора. Только у 1 из 10 больных, получивших МСК, развилась острая РТПХ II стадии по сравнению с 8 из 15 пациентов, которым МСК не вводили. Однако число рецидивов в группе больных, получавших МСК (60% против 20%), оказалось гораздо выше. Авторы делают вывод, что МСК эффективно подавляет РТПХ, но негативно влияют на РТПЛ.

Заключение

Изложенные нами данные экспериментальных исследований свидетельствуют о принципиально новых подходах в лечении РТПХ, требующих дальнейшего углубленного изучения.

Л и т е р а т у р а

1. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. М.: МИА, 2003.
2. Rus V., Svetic A., Nguyen P. et al. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J Immunol* 1995;155(5):2396—406.
3. Via C.S., Shustov A., Rus V. et al. In vivo neutralization of TNF-alpha promotes humoral autoimmunity by preventing the induction of CTL. *J Immunol* 2001;167(12):6821—6.
4. Kim J., Kim H.J., Choi W.S. et al. Maintenance of CD8+ T-cell anergy by CD4+CD25+ regulatory T cells in chronic graft-versus-host disease. *Exp Mol Med* 2006;38(5):494—501.
5. Jiang S., Lechler R.I., He X.S., Huang J.F. Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Hum Immunol* 2006;67(10):765—76.
6. Buckner J.H., Ziegler S.F. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res Ther* 2004;6(5):215—22.
7. Насонов Е.Л., Быковская С.Н. Т-регуляторные клетки при аутоиммунных ревматических заболеваниях. *Вестн РАМН* 2006;(9—10):74—82.
8. Воробьев А.А., Быковская С.Н., Пашков Е.П., Быков А.С. Роль клеток-регуляторов CD4+CD25+ в развитии хронических инфекционных заболеваний. *Вестн РАМН* 2006;(9—10):24—9.
9. DeJaco C., Duftner C., Grubeck-Loebenstein B., Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2006;117(3):289—300.
10. Miyara M., Amoura Z., Parizot C. et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exper Med* 2006;203(2):359—70.
11. Lyssuk E.Y., Torgashina A.V., Soloviev S.K. et al. Reduced number and function of CD4+CD25^{high}FoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exper Med Biol* 2007;601:113—9.
12. Toda A., Piccirillo C.A. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2006;80(3):458—70.
13. Hess A.D., Thoburn C.J. Immune tolerance to self-major histocompatibility complex class II antigens after bone marrow transplantation: role of regulatory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(5):518—29.
14. Joffre O., van Meerwijk J.P. CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in bone marrow transplantation. *Semin Immunol* 2006;18(2):128—35.
15. Trenado A., Charlotte F., Fisson S. et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003;112(11):1688—96.
16. Panoskaltis-Mortari A., Price A., Hermanson J.R. et al. In vivo imaging of graft-versus-host-disease in mice. *Blood* 2004;103(9):3590—8.
17. Anderson B.E., Taylor P.A., McNiff J.M. et al. Effects of donor T-cell trafficking and priming site on graft-versus-host disease induction by naive and memory phenotype CD4 T cells. *Blood*

2008;111(10):5242–51.

18. Clark F.J., Gregg R., Piper K. et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004;103(6):2410–6.

19. Sanchez J., Casano J., Alvarez M.A. et al. Kinetic of regulatory CD25high and activated CD134+ (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2004;126(5):697–703.

20. Miura Y., Thoburn C.J., Bright E.C. et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004;104(7):2187–93.

21. Zorn E., Nelson E.A., Mohseni M. et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006;108(5):1571–9.

22. Mutis T., Aarts-Riemens T., Verdonck L.F. The association of CD25 expression on donor CD8+ and CD4+ T cells with graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions. *Haematologica* 2005;90(10):1389–95.

23. Meignin V., Peffault de Latour R., Zuber J. et al. Numbers of Foxp3-expressing CD4+CD25high T cells do not correlate with the establishment of long-term tolerance after allogeneic stem cell transplantation. *Exper Hematol* 2005;33(8):894–900.

24. Rieger K., Loddenkemper C., Maul J. et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006;107(4):1717–23.

25. Rezvani K., Mielke S., Ahmadzadeh M. et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 2006;108(4):1291–7.

26. Glennie S., Soeiro I., Dyson P.J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105(7):2821–7.

27. Schneider M., Munder M., Karakhanova S. et al. The initial phase of graft-versus-host disease is associated with a decrease of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 2006;28(6):382–90.

28. Wolf D., Wolf A.M., Fong D. et al. Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 2007;83(8):1107–13.

29. Zhai Z., Sun Z., Li Q. et al. Correlation of the CD4+CD25high T-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute GVHD. *Transpl Int* 2007;20(5):440–6.

30. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Латыкина К.С. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок. *Цитология* 1970;12(9):1147–55.

31. Masteller E.L., Tang Q., Bluestone J.A. Antigen-specific regulatory T cells ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol* 2006;18(2):103–10.

32. Trenado A., Sudres M., Tang Q. et al. Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol* 2006;176(2):1266–73.

33. Porada C.D., Zanjani E.D., Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1(3):365–9.

34. Di Ianni M., Del Papa B., De Ioanni M. et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol* 2008;36(3):309–18.

35. Spaggiari G.M., Capobianco A., Becchetti S. et al. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006;107(4):1484–90.

36. Ristich V., Liang S., Zhang W. et al. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 2005;35(4):1133–42.

37. Zheng S.G., Wang J., Wang P. et al. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 2007;178(4):2018–27.

38. Tisato V., Naresh K., Girdlestone J. et al. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 2007;21(9):1992–9.

39. Tian Y., Deng Y.B., Huang Y.J.,

Wang Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells decrease acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Immunol Investig* 2008;37(1):29–42.

40. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exper Hematol* 2002;30(1):42–8.

41. Ringden O., Labopin M., Bacigalupo A. et al. Transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA-identical siblings in adult patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2002;20(24):4655–64.

42. Sudres M., Norol F., Trenado A. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2006;176(12):7761–7.

43. Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B. et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006;108(6):2114–20.

44. Lee S.T., Jang J.H., Cheong J.W. et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol* 2002;118(4):1128–31.

45. Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H. et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007;110(7):2764–7.

46. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21(8):1733–8.

47. 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(3):593–9.