

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

О.С. Татарина¹, Е.Ю. Осипова², С.А. Румянцев²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²ФГУ Федеральный научно-клинический центр
детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: Елена Юрьевна Осипова e_ossipova@mail.ru

Метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), как аутологичных, так и аллогенных, в последние годы используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников и профилактики и терапии реакции «трансплантат против хозяина». В обзоре литературы проанализированы данные об эффективности, безопасности и технологических особенностях использования МСК в клинической практике. Обсуждаются биологические свойства МСК, полученных в результате длительного культивирования, и механизмы их взаимодействия с другими клеточными элементами.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, трансплантация мезенхимальных стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», длительное культивирование

MESENCHYMAL STEM CELLS BIOLOGICAL PROPERTIES AND POSSIBILITIES OF CLINICAL USE

O.S. Tatarinova¹, E.Yu. Osipova², S.A. Roumiantsev²

¹Lomonosov Moscow state university; ²Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology, Moscow

Autolog and allogeneic mesenchymal stem cells (MSC) transplantation currently is used in clinical practice for hematopoietic progenitor engraftment acceleration and graft versus host disease prophylactic and treatment. In this literature review data concerning efficacy, safety and technologies of MSC clinical use are analyzed. Biological properties of MSC received in long-term culture and mechanisms of their interaction with other cells are discussed.

Key words: mesenchymal stem cells (MSC), hematopoietic stem cells transplantation, MSC transplantation, graft versus host disease, long-term culture

Метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), как аутологичных, так и аллогенных, в последние годы используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников и для профилактики и терапии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [1, 2]. Эффективность при РТПХ связана с тем, что МСК обладают иммуносупрессивными свойствами, способны оказывать антипролиферативное влияние на лимфоциты, ингибировать активацию и ответ Т-клеток и клеток памяти [3, 4]. Кроме того, МСК понижают секрецию интерферона- γ (ИНФ- γ) и усиливают (либо не изменяют) секрецию интерлейкина-4 (ИЛ-4), что может способствовать переключению иммунного ответа с преимущественно опосредованного Th1 (с выделением провоспалительных цитокинов) на опосредованный Th2 (с выделением противовоспалительных цитокинов), более предпочтительного при терапии РТПХ.

Помимо этого, установлено, что МСК продуцируют цитокины и ростовые факторы, необходимые для пролиферации и дифференцировки крове-

творных предшественников [5, 6]. Показана клиническая эффективность применения культивированных *ex vivo* МСК при аутологичной и аллогенной трансплантации кроветворных предшественников для сокращения сроков приживления [7, 8].

Однако применение МСК при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) может иметь ряд негативных последствий. В силу того что МСК оказывают неспецифическое иммуносупрессивное действие, у пациентов, получающих терапию МСК, повышается риск развития вирусных, грибковых и бактериальных инфекционных заболеваний, а также, возможно, рецидива лейкоза в связи с ослаблением реакции «трансплантат против лейкоза» [9].

Кроме того, остается неизвестным, оказывает ли терапия МСК значимое влияние на лейкозные клетки, которые даже в состоянии ремиссии, необходимой для проведения трансплантации ГСК (ТГСК), присутствуют в костном мозге в виде минимальной резидуальной болезни, в частности, на их чувствительность к противоопухолевой терапии, которая является важным прогностическим

фактором. С одной стороны, МСК играют важную роль в поддержании гемопоэза и выделяют цитокины и ростовые факторы, стимулирующие пролиферацию и дифференцировку ГСК и бластных клеток костного мозга, а также улучшают приживление ГСК при трансплантации. Можно предположить, что МСК могут оказывать аналогичное действие на лейкозные клетки, которые являются гемопоэтическими предшественниками. С другой стороны, МСК оказывают антипролиферативное влияние на лимфоциты.

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

Определение МСК, их основные свойства

Существование в костном мозге, наряду со стволовыми кроветворными клетками, стволовых клеток стромы, образующих в культуре колонии фибробластоподобных клеток, было впервые показано А.Я. Фриденштейном и соавт. [10], которые выделили фибробластоподобную популяцию, обладающую адгезивными свойствами и способную восстанавливать (регенерировать) зачатки кости *in vivo*. Эти клетки получили название колониеобразующих предшественников фибробластов (КОЕ-ф). Установлено, что КОЕ-ф имеют стволовую природу, т.е. обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в различные мезенхимальные (адипогенную, хондрогенную, остеогенную) клеточные линии [11, 12] и немезенхимальные линии [13–15]. С учетом способности этих клеток к самоподдержанию и дифференцировке в различные клеточные линии мезенхимы, А.И. Caplan [16] ввел термин «мезенхимальные стволовые клетки».

Международным обществом клеточной терапии (ISCT) были внесены некоторые поправки в номенклатуру: введен термин «мультипотентные МСК» и определено, что не всегда МСК являются стволовыми клетками [17]. Кроме того, в терминологию включали источник выделения МСК: жировая ткань, костный мозг и т.д. ISCT был введен минимум критериев для определения мультипотентных МСК [18]:

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

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

Добавление различных факторов в среду для культивирования МСК может приводить к их дифференцировке [10–12].

В костном мозге недифференцированные МСК создают микроокружение для ГСК. Они продуцируют матриксные молекулы, включая фибронектин, ламинин и коллаген [19]. МСК также экспрессируют лиганды для поверхностных молекул клеток гемопоэтических линий: внутриклеточные молекулы адгезии 1-го и 2-го типов, молекулу адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа, функционально-связанный антиген лимфоцитов 3-го типа, молекулу адгезии активированного лейкоцита [20]. При совместном культивировании МСК формируют кластеры с ГСК, мегакариоцитами и остеобластными предшественниками и образуют линейно-специфические колониеобразующие единицы из CD34⁺-клеток костного мозга в долговременных культурах [6, 21]. Кроме того, МСК секретируют цитокины, необходимые для дифференцировки ГСК [6, 20].

Человеческие МСК экспрессируют человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) I класса, а под действием ИФН- γ — и II класса [22]. При исследовании уровня экспрессии поверхностных молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) было показано, что МСК экспрессируют средние уровни молекул I класса, в то время как молекулы МНС II класса на поверхности клеток не выявлялись и были обнаружены лишь внутриклеточные депозиты аллоантигенов II класса в клеточных лизатах при помощи Western blotting-метода [23, 24], стимуляция ИФН- γ повышала содержание молекул как II, так и I классов на поверхности клеток [24]. Экспрессия молекулы HLA-I повышалась при дифференцировке МСК в клетки жировой, костной и хрящевой тканей, но экспрессия молекул II класса при этом не выявлялась [23].

В процессе изучения МСК были выделены из различных тканей, включая жировую ткань, пуповинную кровь, фетальные печень, кровь, костный мозг и легкое [25–28].

Возможности применения МСК для клеточной терапии

При культивировании *in vitro* после нескольких пассажей МСК могут быть применены в клинике для клеточной терапии (рис. 1). Однако остается неизвестным, происходит ли изменение МСК при их культивировании и пассировании; возможно, пролиферация на пластике может приводить к фенотипическим и функциональным изменениям МСК [30, 31], тем более, что даже отдельно взятые клоны МСК отличаются друг от друга по экс-

прессии генов, фенотипу, способности к дифференцировке и экспансии [12, 32, 33].

Направления клеточной терапии, связанные с основными свойствами МСК, могут быть разделены на 3 группы:

1) поддержка кроветворения при котрансплантации с ГСК;

2) замещение и восстановление функции поврежденных негемопоэтических тканей (кости, хряща, скелетных мышц, сердечной мышцы, нервной ткани, печени и др.);

4) подавление иммунных конфликтов при аллогенной неродственной трансплантации и тяжелых аутоиммунных процессах.

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

Второе направление для использования МСК возможно благодаря тому, что МСК проявляют себя *in vivo* как мультипотентные клетки. Было показано, что после введения новорожденным мышам или инфузии *in utero* клетки внедряются в различные органы и в них происходит специфическая для данной ткани дифференцировка МСК [34, 35]. После внутривенного (в/в) введения МСК в небольшом количестве могут быть обнаружены в различных тканях, при этом МСК внедряются преимущественно в очаги повреждения [16, 36—38]. МСК восстанавливают не только мезенхимальные линии тканей: хрящ межпозвоночных дисков [39], кость [40, 41], кардиомиоциты [42], связки [43], но и онтогенетически менее родственные ткани, например нервную ткань [44], эпителиальную ткань кожи, легкого, печени, кишечника, почек и селезенки [36, 45, 46]. Кроме того, внутривенное введение МСК ускоряло регенерацию поврежденных легких, нервной ткани и почек у экспериментальных животных в основном благодаря паракринным механизмам и изменению продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в области повреждения [46—48]. Также можно применять МСК для лечения токсических осложнений ХТ, таких как радиационный гастроэнтерит и геморрагический цистит.

Котрансплантация МСК с ГСК

и роль МСК в поддержании гемопоэза

Это направление клеточной терапии связано с основными свойствами МСК: способностью

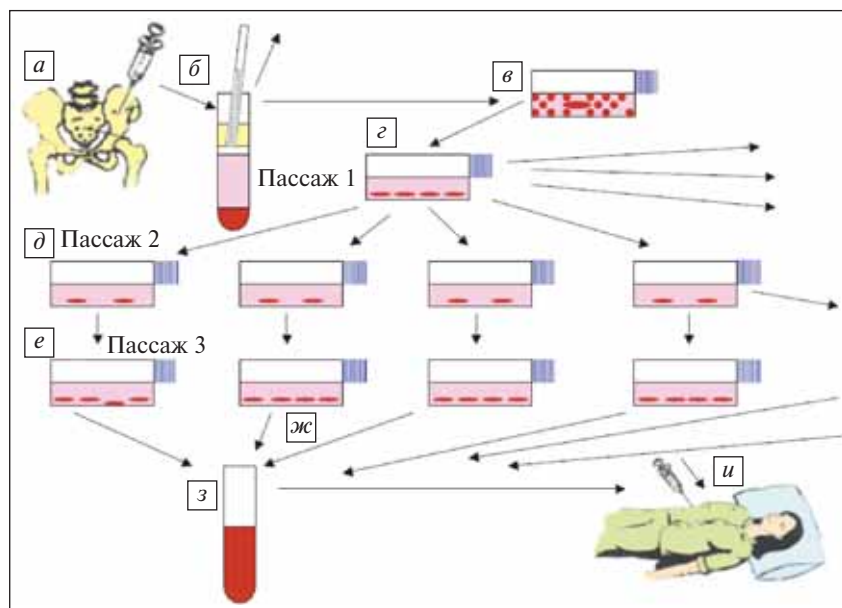


Рис. 1. Выделение МСК и их применение для исследовательской работы и в клинике [29]: а — аспирация костного мозга; б — выделение мононуклеарных клеток по градиенту плотности; в — культивирование клеток во флаконах в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку; г — когда клетки покрывают > 70% поверхности чашки, их снимают при помощи раствора трипсина и д, е — снова высаживают на чашки при меньшей плотности; ж — и — снятие клеток с чашек и использование для их клеточной терапии

формировать стромальное микроокружение кроветворного костного мозга; обеспечивать прикрепление кроветворных клеток и снабжение их необходимыми цитокинами и ростовыми факторами; участвовать в строительстве и васкуляризации костного плацдарма. Изначально основной функцией МСК считалось поддержание гемопоэза [49]. При последующих исследованиях было показано, что человеческие МСК усиливают приживление неродственных выделенных из пуповинной крови ГСК у NOD-SCID-мышей и эмбрионов овцы [50—53]. Лучшее усиление эффекта выявлялось при небольшом количестве ГСК и распространялся на клетки миелоидной, лимфоидной и мегакариоцитарной линий [51—53]. В исследовании В. Maitra и соавт. [53] у 2 из 10 мышей приживление происходило при небольшом количестве ГСК, в то время как у 8 из 10 мышей значительное приживление наблюдалось при котрансплантации клеток пуповинной крови и МСК. Механизм усиления приживления ГСК при действии МСК *in vivo* неизвестен. Один из возможных механизмов — это усиление хоуминга и пролиферации ГСК под действием выделяемых в кровотоке цитокинов, что, однако, может не приводить к хоумингу МСК в костный мозг. В некоторых исследованиях наблюдались усиливающие эффекты, но МСК при этом в костном мозге не обнаруживались [52].

Таким образом, результаты доклинических испытаний котрансплантации МСК с кроветворными стволовыми клетками на экспериментальных

моделях позволили прийти к следующим заключениям:

- трансплантация МСК ускоряет и улучшает приживление ГСК;

- действие МСК, стимулирующее приживание и пролиферацию ГСК, не является линейно-специфическим, способствует в равной мере пролиферации миелоидных и лимфоидных клеток;

- действие МСК реализуется через высвобождение цитокинов, регулирующих приживание (SDF1), пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток (GM-CSF, G-CSF, SCF, ИЛ-6) и иммуносупрессивный эффект (Активин-А) [54].

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

Клинические испытания подтвердили, что МСК могут быть выделены в достаточном количестве из аспирата костного мозга и после 4—7 пассажей в культуре введены пациенту в количестве до 50×10^6 без осложнений и побочных эффектов. При этом МСК, выделенные из костного мозга реципиентов в различные сроки после трансплантации, демонстрируют черты частичного, а чаще полного химеризма [7, 55, 56].

Исследования, проведенные на достаточно большом контингенте больных со злокачественными и незлокачественными заболеваниями, показали, что котрансплантация ГСК с МСК, выращенными в культуре (4—7 пассажей) и введенными в/в в количестве $1—5 \times 10^6$, приводила к ускорению приживления ГСК, восстановлению показателей периферической крови (абсолютное число нейтрофилов и тромбоцитов), а также к снижению частоты и интенсивности острой и хронической РТПХ [8, 55, 56].

Иммуномодулирующие свойства МСК и их применение для лечения иммуноконфликтных состояний

МСК обладают иммуносупрессивными свойствами и способны уменьшать воспаление. Человеческие МСК подавляют аллореактивность лимфоцитов *in vitro* в смешанных культурах лимфоцитов (MLC) благодаря HLA-независимым механизмам [22, 57—59].

Взаимодействие МСК и лимфоцитов *in vitro*

МСК экспрессируют маркеры, характерные для эпителия тимуса, и молекулы адгезии, необходимые для взаимодействия с Т-клетками [20, 28]. При отсутствии иммуносупрессии или механизмов, вызывающих иммунную толерантность, аллогенные клетки отторгаются иммунной системой. Клетки, экспрессирующие МНС-молекулы и подходящие костимулирующие молекулы, стимулируют Т-клетки только прямым путем. Человеческие МСК не экспрессируют молекулы CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) или CD40 даже после стимуляции

ИФН- γ . Аллогенные клетки могут также активировать Т-клетки опосредованно, когда МНС-антигены презентуются антиген-презентирующими клетками (АРС). Недифференцированные МСК, МСК, экспрессирующие аллоантигены II класса после воздействия ИФН- γ , и МСК, дифференцированные в адипоциты, остеокиты и хондроциты, не могут индуцировать пролиферацию аллогенных лимфоцитов даже в присутствии АРС или после проведения костимулирующих сигналов с использованием CD28-специфических антител и CD80-или CD86-генной трансдукции [22, 24, 53, 57, 59—61]. Показателем аллореактивности лимфоцитов может служить продукция активированными лимфоцитами ИФН- γ . МСК не стимулируют продукцию ИФН- γ мононуклеарными клетками периферической крови [24, 41, 53, 58, 61]. В присутствии МСК снижалась экспрессия маркеров, связанных с активацией лимфоцитов: CD25 (ИЛ-2-стимулирующий рецептор), CD38 и CD39 [4, 24]. Однако под действием МСК все-таки наблюдался прайминг лимфоцитов. При совместном культивировании Т-клеток и МСК и последующем культивировании Т-клеток с неразделенной культурой лимфоцитов, выделенных у доноров МСК, активация Т-клеток была практически аналогична таковой при культивировании только с лимфоцитами, выделенными от того же донора [24].

МСК не только не активируют CD4⁺, но также не подвергаются лизису CD8⁺-цитотоксическими лимфоцитами [3, 62]. Даже несортированные донорские лимфоциты, стимулированные *in vitro* РВМС (мезенхимальные клетки периферической крови), лизируют только лимфоциты, но не МСК, выделенные у того же донора [3]. Дальнейшие исследования показали, что МСК запускают abortивную программу активации в полностью дифференцированных CD8⁺-Т-клетках, при этом главные эффекторные функции не активируются. Кроме того, МСК не подвергаются специфическому лизису NK-клетками [3].

Взаимодействие МСК и Т-лимфоцитов

МСК обладают иммуносупрессивными свойствами и ингибируют ответ наивных Т-клеток и клеток памяти в смешанной лимфоцитарной культуре (СКЛ) и культуре, индуцированной митогенами [4, 24, 53, 57, 63, 64]. Супрессия не зависит от МНС и наиболее выражена, если МСК добавляются в первый день 6-дневной культуры. Степень супрессии является дозозависимой. Значительное ингибирование наблюдается, когда используется большое количество МСК (лимфоциты >1:10). При добавлении меньшего количества МСК (1:100—1:10 000) пролиферация Т-клеток усиливалась [59, 60, 65]. Супрессивный эффект МСК сохранялся и при их дифференцировке в остеокиты, адипоциты и хондроциты и усиливался при предшествующей обработке ИФН- γ [23]. Супрессивное

действие человеческих МСК проявлялось при разделении МСК и лимфоцитов при помощи проницаемой мембраны [3, 22, 24, 58, 63].

Субпопуляцию наивных $CD4^+$ -Т-клеток, экспрессирующих CD25, называют регуляторными Т-клетками, они имеют потенциальную супрессорную активность [66, 67]. МСК увеличивают количество

$CD4^+CD25^{hi-}$, $CD4^+CTLA4^+$ и $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ -клеток среди стимулированных ИЛ-2 лимфоцитов и в MLC [68, 69] (рис. 2).

Под действием МСК снижалась экспрессия CXCR4, 5 и CCR7. При соотношении МСК:лимфоциты 1:10 МСК стимулировали секрецию антител В-клетками [70].

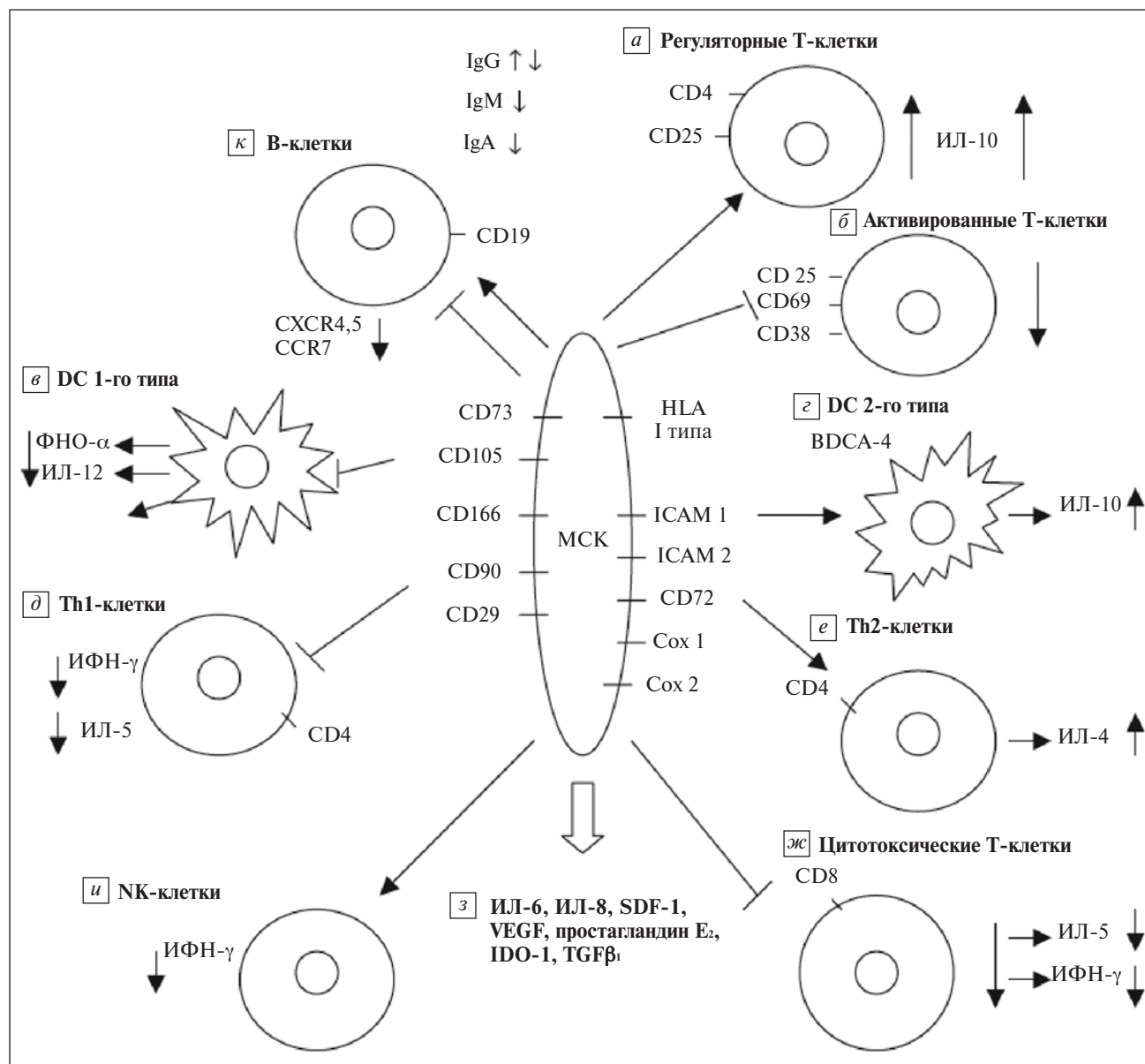


Рис. 2. Влияние МСК на клетки иммунной системы [29]: а — МСК увеличивают соотношение $CD4^+$ -, $CD25^+$ -клеток и продукцию ИЛ-10; б — уменьшают экспрессию маркеров активации Т-клеток, CD25, CD69 и CD38; замедляют созревание APC и уменьшают экспрессию HLA-DR; в — дендритные клетки — DC) 1-го типа снижали продукцию ФНО-α и ИЛ-12 при культивировании с МСК; г — МСК повышают секрецию ИЛ-10 ЛПС-стимулированными DC 2-го типа, снижают секрецию ИЛ-5 $CD4^+$ -клетками; д — образование ИФН-γ Th1-клетками значительно снижалось под действием МСК; е — Th2-клетки; ж — МСК ингибируют смешанные культуры лимфоцитов и последующее развитие цитотоксических Т-клеток благодаря растворимым факторам; з — растворимые факторы, вырабатываемые МСК: ИЛ-6, ИЛ-8, фактор роста стромального происхождения-1 (SDF-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). К растворимым факторам, ингибирующим активацию Т-клеток, относят простагландин E_2 , индуцирующий регуляторные Т-клетки, индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), образование IDO стимулируется ИФН-γ, IDO катализирует превращение триптофана в кинуренин и ингибирует Т-клеточный ответ путем деплеции триптофана. К растворимым факторам, ингибирующим Т-клеточный ответ, относят TGFβ, фактор роста гепатоцитов; и — при культивировании с МСК чистой культурой НК-клеток значительно снижалось образование ИФН-γ; к — МСК снижали пролиферацию В-клеток и секрецию иммуноглобулинов В-клетками при соотношении МСК:лимфоциты 1:1

Количество CD25⁺- и CD38⁺-клеток в митоген-стимулированной культуре лимфоцитов уменьшалось в присутствии МСК [4, 71]. Деpletion CD25⁺ до стимуляции митоген-активированными моноцитами не влияет на способность МСК ингибировать пролиферацию Т-клеток [61]. МСК также продуцируют костный морфогенный протеин-2, который вызывает иммуносупрессию посредством образования CD8⁺-регуляторных Т-клеток [72].

В присутствии стимуляторов образования Т-хелперов 1-го типа (Th1), таких как CD3, CD28, ИЛ-4, ИЛ-2 и ИЛ-12, наивные Т-клетки превращаются в клетки, секретирующие ИФН- γ . В присутствии МСК секреция ИФН- γ снижалась (см. рис. 2) [68]. МСК стимулируют Th2-дифференцировку. При добавлении в MLC МСК уменьшали лизис под действием CD8⁺-Т-клеток [3], а при добавлении МСК в цитотоксической фазе цитотоксический эффект не проявлялся [3, 60, 62, 69]. МСК могут ингибировать аллореактивный процесс и предотвращать образование цитотоксических Т-клеток, однако при активации цитотоксических Т-клеток они неэффективны.

Человеческие МСК подавляют развитие CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток благодаря растворимым факторам [3, 24, 63]. Факторы, оказывающие супрессорное действие (предполагается, что их несколько), вырабатываются МСК непостоянно, так как супернатанты культуры МСК не подавляют пролиферацию Т-клеток (см. рис. 2) [4, 53, 60, 73]. Пролиферация чистой культуры Т-клеток частично восстанавливается при добавлении антител против фактора роста гепатоцитов и трансформирующего ростового фактора β_1 (TGF β_1) [59, 62, 63]. Некоторые авторы считают, что основную роль играют ИФН- γ , ИЛ-10, фактор некроза опухоли (ФНО- α) и ИЛ-2 [22, 24, 53, 57, 60, 61]. J. Liu и соавт. [65] показали, что антитела, специфичные к FasL и TGF β_1 , ослабляют супрессивное действие МСК на стимулированные конканавалином А MLC, эффект был дозозависимым, антитела к ИЛ-10 эффекта не оказывали. МСК могут ингибировать пролиферацию Т-клеток путем продукции IDO. Образование IDO стимулируется ИФН- γ [74], IDO катализирует превращение триптофана в кинуренин и ингибирует Т-клеточный ответ путем деплеции триптофана [75]. ИФН- γ оказывает дозозависимый стимулирующий эффект на активность IDO. Добавление триптофана восстанавливает пролиферацию Т-клеток, предполагают, что активность IDO может действовать как эффекторный механизм ингибирования Т-клеток. Активация регуляторных Т-клеток может происходить под действием простагландина E₂ (PGE₂), который синтезируется с помощью фермента циклооксигеназы (ЦОГ) [76]. МСК постоянно вырабатывают ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [68, 77]. При совместном культивировании Т-клеток с МСК повышалась продукция ЦОГ-2 и PGE₂ [22, 68]. Ингиби-

торы синтеза PGE₂ сохраняли пролиферацию фитогемагглютин-активированных (ФГА) лимфоцитов при культивировании с МСК [68].

W.T. Tse и соавт. [22] исследовали аллореактивные лимфоциты и сравнили их с митоген-стимулированными культурами. Полученные результаты свидетельствовали о том, что продукция МСК ИЛ-10, TGF β , PGE₂ и деплеция триптофана не играли роли в супрессии MLC.

В противоречивости результатов может быть несколько причин. W.T. Tse и соавт. [22] исследовали культуры неразделенных моноклеарных клеток-респондеров, в других исследованиях использовали чистую культуру Т-клеток. Ранее было показано, что результаты изменяются в зависимости от способа активации лимфоцитов [64]. При культивировании МСК с MLC в лимфоцитах повышались транскрипция и трансляция ИЛ-2 и растворимых рецепторов к ИЛ-2, после митогенной стимуляции лимфоцитов уровни экспрессии снижались. При добавлении МСК к культуре лимфоцитов в MLC повышалась секреция ИЛ-10, в ФГА-стимулированных культурах — не изменялась. Добавление индометацина, ингибирующего синтез PGE₂, частично восстанавливало ингибирующий эффект МСК на ФГА-стимулированные лимфоциты, но не MLC [64].

Степень проявления иммуномодулирующих свойств МСК вариабельна [22]. Противоречивость результатов может быть объяснена использованием различных культур лимфоцитов, различием условий и кинетики. Как было отмечено ранее, существуют видоспецифические различия. Могли изменяться дозы МСК. В некоторых работах соотношение МСК:лимфоциты было $\geq 1:1$ [53, 61, 63, 69, 78], в то время как в большинстве исследований клетки используют в соотношении 1:10 [3, 4, 22—24, 59, 63, 64, 69]. В исследованиях зависимости эффектов МСК от их количества было обнаружено, что большее число МСК оказывало иммуносупрессивный эффект, в то время как небольшое их количество иногда даже усиливало пролиферацию лимфоцитов [59, 65]. Как бы то ни было, соотношение МСК:лимфоциты 1:10 *in vitro* значительно отличается от физиологического, так как содержание МСК в костном мозге $< 1:10\,000$ моноклеарных клеток [79]. Таким образом, большее число МСК, необходимое для получения эффекта, является чрезмерным для экспериментов *in vivo* и терапевтического применения.

Влияние МСК на APC

МСК снижают активацию Т-клеток опосредованно через уменьшение образования DC из моноцитов [69]. Кроме того, МСК ингибируют дифференцировку и функционирование образуемых из моноцитов DC в трансвелл-системах [80]. После удаления МСК ингибирующий эффект не наблюдался [61]. МСК снижали позитивную регуляцию

CD1A, CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), HLA-DR и повышали регуляцию CD83 при созревании DC [61, 68, 69, 81]. Важно, что DC, выделенные из культур, культивируемых с МСК, имели более низкую способность активировать CD4⁺ в MLC [80].

Мезенхимальные стволовые клетки уменьшали секрецию ИФН- γ , ИЛ-12 и ФНО- α DC, при этом продукция супрессорного цитокина ИЛ-10 повышалась (см. рис. 2) [61, 64, 68, 80]. ФНО- α ингибирует созревание DC, их миграцию и способность стимулировать аллореактивные Т-клетки и, кроме того, может играть роль в индукции иммуносупрессивных эффектов МСК. Похожим образом мышинные стромальные клетки селезенки увеличивали образование ИЛ-10 и уменьшали образование ИФН- γ DC, демонстрируя тем самым, что МСК, дифференцированные в стромальные клетки, имеют аналогичные свойства [82]. CD14⁺-моноциты активируют секрецию МСК-растворимых факторов, включая ИЛ-1 β , который ингибирует аллореактивные Т-клетки [71]. Скорее всего влияние МСК на APC приводит к ингибированию активации Т-клеток.

Влияние МСК на NK-клетки

МСК уменьшают секрецию ИФН- γ NK-клетками, стимулированными ИЛ-2 (см. рис. 2) [68]. МСК не ингибируют лизис K562-клеток NK-клетками [3]. При соотношении МСК:лимфоциты 1:1 наблюдалось ингибирование цитотоксической функции CTL и NK-клеток, данные эффекты не сохранялись при соотношении 1:10 [69]. Таким образом, можно предположить, что только высокие дозы МСК могут уменьшить экспансию CD8⁺-Т и NK-клеток. Однако столь высокие концентрации МСК не могут быть применены *in vivo*.

Влияние МСК на В-лимфоциты

МСК могут ингибировать пролиферацию лимфоцитов, индуцированную митогенами В-клеток, митогеном фитолакки и протеином *A Staphylococcus aureus* [59, 65, 73, 78, 83]. Тем не менее стимуляция лимфоцитов митогеном фитолакки зависит от Т-клеток, и протеин А стимулирует пролиферацию Т- и В-клеток [84]. В связи с этим нельзя разделить пролиферацию В- и Т-клеток. МСК ингибировали стимуляцию В-клеток благодаря растворимым факторам анти-CD40 и анти-ИЛ-4 [78, 83]. Пролиферация В-клеток останавливалась в фазе G₀/G₁ клеточного цикла, апоптоза при этом не наблюдалось. При добавлении МСК к активированной чистой культуре В-клеток в соотношении 1:1 снижались количество Ig-продуцирующих клеток и уровни IgM, IgG и IgA, при уменьшении числа МСК данные эффекты не наблюдались [77]. МСК не снижали продукцию ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-4 и ИЛ-10. МСК снижали продукцию рецепторов CXCR4, CXCR5 и CCR7B к хемокинам, а также хемотаксис к CXCL12 CXCR4-лиганда, CXCR5-лиганда

к CXCL13; возможно, большее количество МСК может действовать на хемотаксические свойства В-клеток. При концентрации МСК в 10 раз ниже концентрации лимфоцитов происходила стимуляция В-клеток крови и селезенки, приводящая к продукции IgG в Elispot [70]. При разделении МСК и клеток селезенки при помощи полупроницаемой мембраны стимуляция продукции IgG определялась в нефракционированных клетках селезенки, но не в обогащенных В-клетках. Таким образом, активация В-клеток МСК может происходить под действием растворимых факторов, продуцируемых обкладочными клетками. МСК могут как ингибировать, так и стимулировать В-клетки в зависимости от дозы, источника для выделения МСК и тест-системы (см. рис. 2). Эти результаты могут противоречить потенциальному использованию МСК для лечения аутоиммунных заболеваний, при развитии которых основную роль играют В-клетки. Ингибирование В-клеток *in vitro* выявило при высоких дозах МСК, которые могут быть небезопасны для терапевтического использования. В меньших дозах МСК активировали В-клетки.

Иммуномодулирующие свойства МСК *in vivo* и их терапевтическое значение

Иммуномодулирующие эффекты МСК исследованы на различных животных моделях при аллореактивных иммунных (трансплантация органов и стволовых клеток), аутоиммунных процессах или противоопухолевом иммунитете. Одно из первых исследований *in vivo* показало, что инфузия аллогенных МСК, выделенных из костного мозга павиана, продлевала выживаемость аллогенных кожных трансплантатов до 11 дней в сравнении с 7 днями у животных, не получавших МСК [57]. Кроме того, было показано, что инфузия сингенных МСК хозяина приводила к снижению отторжения аллогенных трансплантатов стволовых клеток на мышинных моделях аллогенной трансплантации костного мозга [85], хотя иммунологические механизмы, лежащие в основе этих наблюдений, не были объяснены.

Один из наиболее ярких эффектов МСК наблюдается при лечении болезни «трансплантат против хозяина» после аллогенной ТГСК. Системное введение выращенных в культуре МСК, выделенных из жировой ткани, позволяло снизить летальность от РТПХ у мышей, которым проводилась ТГСК от гаплоидентичного донора [86]. Это исследование показало, что только ранняя инфузия МСК после трансплантации была эффективна для контроля РТПХ. Более того, предполагалось, что только повторные инфузии МСК могут приводить к уменьшению проявлений РТПХ и это может объяснить последние наблюдения, при которых однократное введение МСК одновременно с ТГСК не влияло на частоту развития и серьезность РТПХ у мышей [87].

В исследовании E. Zappia и соавт. [48] мышечные МСК уменьшали проявления экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита на модели человеческого рассеянного склероза путем индукции толерантности периферических Т-клеток против патогенных антигенов [88]. Инфузия МСК была эффективна только при введении в начале и в период разгара болезни (пика). С другой стороны, инфузия МСК была неэффективна при коллаген-индуцированном артрите (КИА) при работе на мышечных моделях ревматоидного артрита (РА) [89].

G.D. Wu и соавт. [90] показали, что при трансплантации сердца у крыс хоуминг МСК происходил в области отторжения трансплантата.

F. Djouad и соавт. [72] установили, что МСК предотвращают отторжение аллогенных опухолевых клеток у иммунокомпетентных мышей. При системном введении МСК или при введении подкожно одновременно с B16 клетками меланомы происходило формирование опухолей, в то время как клетки меланомы, вводимые без МСК, элиминировались иммунной системой хозяина. Кроме того, МСК оказывали защитное влияние на ткани на моделях ишемии/реперфузии крысиной почки, возможно, обусловленное секрецией растворимых иммуномодулирующих факторов [47]. Инфузия крысиных МСК на экспериментальных крысиных моделях гломерулонефрита приводила к ускорению восстановления гломерул, вероятно, связанному с высвобождением ростовых факторов [91]. В один ряд с этими исследованиями можно поставить работы, демонстрирующие, что приживление МСК происходит преимущественно в области повреждения или опухолевого роста [92].

Иммуносупрессивные свойства МСК представляют огромный интерес для трансплантации органов и ГСК для предотвращения отторжения трансплантата и РТПХ после трансплантации. Первые клинические исследования были выполнены с целью оценки безопасности инфузии МСК. Клинические исследования, проведенные на больных раком легкого [8], показали, что инфузия МСК была безопасной и приводила к быстрому восстановлению гемопоэза. В мультицентровом клиническом исследовании выращенные в культуре МСК, выделенные из костного мозга HLA-идентичных сиблингов, вводились одновременно с HLA-идентичными ГСК 46 пациентам, перенесшим аллогенную ТГСК после миелоаблативных режимов кондиционирования [93]. МСК вводились за 4 ч до инфузии ГСК, при этом побочных эффектов, связанных с инфузией, эктопического формирования ткани или повышения частоты возникновения или тяжести РТПХ не наблюдалось. Также не отмечено ускорения приживления ГСК или отсутствия признаков отторжения трансплантата.

В Европейском мультицентровом исследовании I—II фазы принимали участие 13 детей, пере-

несшие ТГСК от гаплоидентичного донора в сочетании с трансплантацией МСК, выделенных у того же донора [94]. Побочных эффектов сразу после введения МСК не выявлено. В то же время отторжение трансплантата в контрольной группе наблюдалось у 20% из 52 больных. У всех пациентов, получивших МСК, имело место приживление и ускоренное восстановление лейкоцитарного пула в периферической крови, при этом скорость восстановления числа тромбоцитов и нейтрофилов не отличалась от контрольной группы. Кроме того, потенциальные преимущества терапии МСК были продемонстрированы при описании клинических случаев. Результаты этих клинических случаев свидетельствуют не только о возможности использования МСК для профилактики развития РТПХ, но и о лечении РТПХ кишечника после ТГСК [1]. Были описаны случаи лечения острой и хронической РТПХ при помощи МСК. Побочных эффектов после введения МСК не наблюдалось. Из 40 пациентов с тяжелой острой РТПХ у 19 наблюдалось полное выздоровление, у 9 — улучшение состояния, у 7 — ответ на терапию отсутствовал, у 4 — имела место стабилизация заболевания, состояние 1 больного не было оценено из-за короткого периода наблюдения. Двадцать один пациент выжил с периодом наблюдения от 6 нед до 3,5 года после трансплантации. У 9 из них наблюдалась экстенсивная хроническая РТПХ [2]. В двух проспективных рандомизированных европейских исследованиях III фазы изучалось использование МСК для лечения и профилактики острой РТПХ после аллогенной ТГСК.

Механизмы, лежащие в основе иммуномодулирующих эффектов МСК *in vivo*, в настоящий момент активно обсуждаются. Выделить МСК из костного мозга реципиентов, получивших ТГСК, очень сложно. Это может быть связано с тем, что МСК мигрируют в другие ткани и органы, где оказывают иммуносупрессивное действие. Исследования на животных показали, что МСК мигрировали в лимфоидные органы [48] и приживление их происходило в участках повреждения тканей или опухолевого роста [92]. В нескольких работах было отмечено, что МСК после системного введения неспецифически мигрируют в капиллярное русло различных тканей и органов, преимущественно легких [36]. Интересно, что исследование на мышах показало, что экспансия МСК *ex vivo* значительно уменьшает их способность к хомингу и приживлению [95].

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

В ряде работ, упомянутых ранее, было продемонстрировано, что МСК оказывают антипролиферативное влияние на клетки иммунной системы. Однако, по мнению ряда авторов, антипролиферативные эффекты МСК этим не ограничиваются

и наблюдаются также при воздействии МСК на клетки других органов и тканей, включая гемопоэтические и негемопоэтические опухолевые линии клеток.

При сравнении пролиферации, чувствительности к ХТ и уровня экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (MDR1) в лейкоэмических клетках линии K562 до и после культивирования с МСК были получены следующие результаты: совместное культивирование с МСК и наличие прямых межклеточных контактов приводило к подавлению роста и пролиферации K562 (увеличивалось количество лейкоэмических клеток в фазе G₀/G₁, уменьшалось число клеток в фазе S), усилению резистентности к ХТ клеток K562 (количество клеток K562 в состоянии индуцированного дауномицином апоптоза в культуре с МСК было меньше, чем в суспензии K562). В то же время экспрессия гена MDR1 в культуре с МСК не изменялась [96]. Похожие результаты, свидетельствующие о подавлении пролиферации лейкоэмических клеток при совместном культивировании со стромальными клетками, описаны в работах 2009 г. Установлено, что МСК оказывают ингибирующее влияние на пролиферацию лейкоэмических клеток линии K562 [97, 98]. Рассматривалась роль молекулы DKK-1 (dickkopf-1), секретируемой МСК и являющейся негативным регулятором WNT-сигнальных путей, в ингибировании пролиферации. При нейтрализации DKK-1, анти-DKK-1 антителами или при снижении экспрессии гена DKK-1 ингибирующий эффект МСК на пролиферацию лейкоэмических клеток линии K562 уменьшался. Экспрессия DKK-1 МСК регулируется NANOG — транскрипционным фактором, вырабатываемым в некоторых стволовых клетках. Выявлено, что МСК могут ингибировать пролиферацию K562 в гуморальном микроокружении. Тот же эффект наблюдался в первичных лейкоэмических гемопоэтических предшественниках, выделенных у пациентов [97].

В исследовании 2002 г. было показано, что стромальные клетки предотвращают апоптоз миелобластных клеток за счет повышения экспрессии генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в них. В клетках линий HL-60 и NB-4 при совместном культивировании со стромальными клетками линии MS-5 снижались уровни апоптоза, индуцируемого бессывороточной средой и цитозаром. Подобный эффект зафиксирован при культивировании лейкоэмических клеток в кондиционированной MS-5-клетками среде и частично сохранялся, когда лейкоэмические клетки были отделены от стромальных при помощи микропористой мембраны. Совместное культивирование повышало экспрессию гена Bcl-2 в лейкоэмических клетках. В 57 образцах при совместном культивировании возрастал также уровень экспрессии Bcl-X_L. В клетках пациентов, резистентных к индукционной терапии, при куль-

тивировании со стромальными клетками значительно повышалась экспрессия Bcl-2, однако в клетках больных, чувствительных к химиотерапии, столь значимого повышения не отмечалось [99]. Похожие результаты, свидетельствующие об уменьшении индуцированного даунорубицином (DNR) апоптоза лейкозных клеток U937, вероятно, за счет повышения в них экспрессии генов, связанных с апоптозом, в первую очередь Bcl-X_L, под действием МСК, были получены Y.M. Lin и соавт. [100] в 2006 г. Помимо снижения уровня индуцируемого DNR апоптоза, имело место снижение пролиферации U937 (человеческих клеток миеломоноцитарной лейкемии) под действием МСК, выделенных из костного мозга здоровых доноров: увеличивалось количество клеток в фазах G₀/G₁, число клеток в фазах G₂/M уменьшалось в сравнении с чистой культурой U937. Из 487 генов, связанных с апоптозом, при инкубации с МСК изменялась экспрессия 39. Среди 37 активированных генов наиболее активно экспрессировался ген Bcl-X_L. Экспрессия двух генов снижалась. Совместное культивирование с МСК не индуцировало образование MDR1 мРНК в клетках U937 [100].

В работе 2003 г. проводилось совместное культивирование лейкоэмических клеток линии HL-60 с HFCL (human bone marrow fibroblastoid stromal cell line — человеческие фибробластоподобные стромальные клетки). Клетки культивировали в трансвелл-системах и при непосредственном контакте культур без разделения. Исследование показало, что совместное культивирование с HFCL ингибирует пролиферацию HL-60 в сравнении с чистой культурой HL-60. При совместном культивировании с HFCL снижались митотический индекс культуры HL-60, экспрессия ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) HL-60-клетками в сравнении с чистой культурой HL-60. Кроме того, процент клеток HL-60 в G₁-фазе при совместном культивировании с HFCL был выше, чем в культуре без HFCL, а доля клеток в S-фазе была ниже. Также установлено, что совместное культивирование с HFCL подавляет экспрессию VEGF в клетках HL-60 [101].

При изучении влияния линии HFCL на пролиферацию, дифференцировку и чувствительность к ХТ AML-клеток (линий U937, HL-60 и мультирезистентной культуры — MDR HL60/VCR) культивирование клеточных линий производилось аналогичным образом: при непосредственном контакте с клетками линии HFCL или при разделении при помощи трансвелл-системы. Продемонстрировано, что HFCL подавляют пролиферацию лейкозных клеток в сравнении чистой культурой AML-клеток (процент лейкоэмических клеток в фазе G₁ был выше при совместном культивировании с HFCL, нежели в чистой культуре, а доля клеток в S-фазе была ниже). Также было показано, что

HFCL могут индуцировать дифференцировку моноцитов при совместном культивировании: несколько увеличивалось число NBT-положительных клеток и повышалась экспрессия CD11b и CD14.

HFCL могут препятствовать ТРТ-индуцированному апоптозу HL-60- и HL-60/VCR-клеток за счет модуляции Bcl-2 и активированной каспазы 3-го типа. При терапии ТРТ HL-60- и HL-60/VCR-клетки имели морфологические признаки, характерные для апоптоза, увеличивались отношение G_0/G_1 HL-60-и HL-60/VCR-клеток и количество клеток в фазе sub- G_1 . Процент Annexin V-положительных клеток и апоптотических клеток увеличивался при экспрессии активированной каспазы-3 и снижении экспрессии Bcl-2. При культивировании с HFCL-клетками доля Annexin V-положительных и апоптотических клеток уменьшалась, а также сокращалось число клеток в фазе sub- G_1 . После культивирования с HFCL в трансвелл-системе экспрессия активированной каспазы-3 снижалась, а экспрессия Bcl-2 повышалась.

При культивировании с HFCL без разделения в течение 96 ч в HL-60-клетках возрастала экс-

прессия 582 генов и снижалась — 1323, по меньшей мере в 2 раза (данные получены при помощи Affymetrix GeneChip Human Genome U133 set A). Изменение экспрессии некоторых генов выявлено при помощи полимеразной цепной реакции в режиме обратного времени и northern blot [102].

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

Как подобные эффекты будут проявляться *in vivo* и влиять на прогноз пациентов, получающих терапию МСК, остается неизвестным. Однако в последнее время появляются работы, свидетельствующие о том, что при котрансплантации МСК и ГСК увеличивается частота развития рецидивов лейкоза у пациентов со злокачественными заболеваниями крови [103].

Л и т е р а т у р а

1. Le Blanc K., Rasmuson 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.
2. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371(9624):1579—86.
3. Rasmuson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003;76:1208—13.
4. Le Blanc K., Rasmuson I., Götherström C. et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004;60:307—15.
5. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166:585—92.
6. Cheng L., Qasba P., Vanguri P., Thiede M.A. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and proplatelet formation from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol* 2000;184:58—69.
7. Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L. et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:557—64.
8. Кос О.Н., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfection 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.
9. Horowitz M.M., Gale R.P., Sondel P.M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555—62.
10. Фриденштейн А.Я., Петракова К.В., Куралесова А.И., Фролова Г.П. Клетки-предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантатов костного мозга. *Цитология* 1968;5:557—67.
11. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71—74.
12. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143—7.
13. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164:247—56.
14. Caplan A.I., Bruder S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001;7:259—64.
15. Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L. et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291—302.
16. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641—50.
17. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393—5.
18. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315—7.
19. Chichester C.O., Fernandez M., Minguell J.J. Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun* 1993;1:93—9.
20. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D. et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176:57—66.
21. Majumdar M.K., Banks V., Peluso D.P., Morris E.A. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 2000;185:98—106.
22. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389—97.
23. Le Blanc K., Tammik L., Zetterberg E., Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:890—6.

24. Klyushnenkova E., Mosca J.D., Zernetkina V. et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 2005;12:47–57.
25. Erices A., Conget P., Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235–42.
26. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first – trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396–402.
27. Noort W.A., Kruisselbrink A.B., in't Anker P.S. et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002;30:870–8.
28. De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A. et al. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101–9.
29. Le Blanc K., Ringden O.K. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007;262(5):509–25.
30. Banfi A., Muraglia A., Dozin B. et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 2000;28:707–15.
31. Banfi A., Bianchi G., Notaro R. et al. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2002;8:901–10.
32. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000;113(7):1161–6.
33. Tremain N., Korkko J., Ibberson D. et al. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells* 2001;19:408–18.
34. Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6:1282–6.
35. Pochampally R.R., Neville B.T., Schwarz E.J. et al. Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9282–5.
36. Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001;169:12–20.
37. Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M. et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003;5:1028–38.
38. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M. et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003;101:2999–3001.
39. Crevensten G., Walsh A.J., Ananthakrishnan D. et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 2004;32:430–4.
40. Arinze T.L., Peter S.J., Archambault M.P. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85A:1927–35.
41. Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R. et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfect. *Science* 2004;303:1198–201.
42. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93–8.
43. Murphy J.M., Fink D.J., Hunziker E.B., Barry F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3464–74.
44. Sugaya K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int Rev Cytol* 2003;228:1–30.
45. Deng Y., Guo X., Yuan Q., Li S. Efficiency of adenoviral vector mediated CTLA4Ig gene delivery into mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1649–54.
46. Ortiz L.A., Gambelli F., McBride C. et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8407–11.
47. Togel F., Hu Z., Weiss K. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:31–42.
48. Zappia E., Casazza S., Pedemonte E. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106:1755–61.
49. Dexter T.M., Spooner E., Schofield M. et al. Hematopoietic stem cells and the problem of self-renewal. *Blood Cells* 1984;10:315–39.
50. Almeida-Porada G., Flake A.W., Glimp H.A., Zanjani E.D. Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero. *Exp Hematol* 1999;27:1569–75.
51. Angelopoulou M., Novelli E., Grove J.E. et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2003;31:413–20.
52. Anker P.S., Noort W.A., Kruisselbrink A.B. et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2003;31:881–9.
53. Maitra B., Szekely E., Gjini K. et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:597–604.
54. Владимирская Е.Б. Механизмы кроветворения и лейкогенеза: Цикл лекций. М.: Династия, 2007.
55. 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;118:1128–31.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11–20.
60. Potian J.A., Aviv H., Ponzio N.M. et al. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* 2003;171:3426–34.
61. Beyth S., Borovsky Z., Mevorach D. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005;105:2214–9.
62. Angoulvant D., Clerc A., Benchalal S. et al. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to

- alloantigens. *Biorheology* 2004;41:469—76.
63. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838—43.
 64. Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005;305:33—41.
 65. Liu J., Lu X.F., Wan L. et al. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. *Transplant Proc* 2004;36:3272—5.
 66. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151—64.
 67. Blazar B.R., Taylor P.A. Regulatory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:46—9.
 68. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815—22.
 69. Maccario R., Podesta M., Moretta A. et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90:516—25.
 70. Rasmusson I., Le Blanc K., Sundberg B., Ringden O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 2007;65:336—43.
 71. Groh M.E., Maitra B., Szekely E., Koc O.N. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005;33:928—34.
 72. 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.
 73. Augello A., Tasso R., Negrini S.M. et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005;35:1482—90.
 74. Meisel R., Zibert A., Laryea M. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619—21.
 75. Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191—3.
 76. Akasaki Y., Liu G., Chung N.H. et al. Induction of a CD4⁺ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol* 2004;173:4352—9.
 77. Arikawa T., Omura K., Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004;200:400—6.
 78. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006;107:367—72.
 79. Friedenstein A., Kuralesova A.I. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation* 1971;12:99—108.
 80. Jiang X.X., Zhang Y., Liu B. et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;105:4120—6.
 81. Zhang W., Ge W., Li C. et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004;13:263—71.
 82. Svensson M., Maroof A., Ato M., Kaye P.M. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 2004;21:805—16.
 83. Glennie S., Soeiro I., Dyson P.J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105:2821—7.
 84. Ringden O., Rynnel-Dagöö B. Activation of human B and T lymphocytes by protein A of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Immunol* 1978;8:47—52.
 85. 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;108:2114—20.
 86. Yanez R., Lamana M.L., Garcia-Castro J. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of graft-versus-host disease (GVHD). *Stem Cells* 2006;24:2582—91.
 87. 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;176:7761—7.
 88. Zhang J., Li Y., Chen J. et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* 2005;195:16—26.
 89. Djouad F., Fritz V., Apparailly F. et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1595—603.
 90. Wu G.D., Nolta J.A., Jin Y.S. et al. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 2003;75:679—85.
 91. Kunter U., Rong S., Djuric Z. et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2202—12.
 92. Studeny M., Marini F.C., Champlin R.E. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002;62:3603—8.
 93. Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M. et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:389—98.
 94. Ball L.M., Bernardo M.E., Locatelli F. et al. Cotransplantation of haploidentical bone marrow derived mesenchymal stem cells overcomes graft dysfunction and improves hematological and lymphocyte recovery in haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108: Abstract 3118.
 95. Rombouts W.J., Ploemacher R.E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 2003;17:160—70.
 96. Lin Y.M., Bu L.M., Yang S.J. et al. Influence of human mesenchymal stem cells on cell proliferation and chemosensitivity of K562 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2006;14(2):308—12.
 97. Zhu Y., Sun Z., Han Q. et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009;23(5):925—33.
 98. Ding Y., Lu H., Lu S.F. et al. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation and apoptosis of k562 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2009;17(1):137—40.
 99. Konopleva M., Konoplev S., Hu W. et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002;16(9):1713—24.
 100. Lin Y.M., Zhang G.Z., Leng Z.X. et al. Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin Med J (Engl)* 2006;119(11):905—10.
 101. Liang R., Huang G.S., Chen X.Q. et al. Effects of human fibroblastoid stromal cell line on proliferation of HL-60 cells and expression of VEGF. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2003;11(5):476—9.
 102. Liang R., Huang G.S., Wang Z. et al. Effects of human bone marrow stromal cell line (HFCL) on the proliferation, differentiation and apoptosis of acute myeloid leukemia cell lines U937, HL-60 and HL-60/VCR. *Int J Hematol* 2008;87(2):152—66.
 103. 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.