

## Иммунорегуляторные свойства клеток фетальной печени человека

Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

### Immunoregulative properties of human fetal hepatic stem cells

Yu.A. Petrenko

Institute for problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, Kharkov

Фетальная печень человека (ФПЧ) является уникальным органом, в котором содержатся стволовые кроветворные клетки и их коммитированные потомки различной степени зрелости. В настоящей работе проведено определение содержания иммунокомпетентных клеток в ФПЧ 9–10 недель гестации по фенотипическим свойствам и реакции на митогены, а также исследовано влияние клеток ФПЧ на пролиферацию лимфоцитов периферической крови взрослых доноров при совместном культивировании.

Суспензию клеток ФПЧ получали неферментативным методом с использованием вибрации. Клетки криоконсервировали под защитой 5% ДМСО со скоростью 1 °С/мин. Фенотипический анализ проводили с использованием флуоресцентной микроскопии. Пролиферативную активность клеточных культур ФПЧ и лимфоцитов периферической крови (ЛПК) взрослых доноров определяли по включению <sup>3</sup>H–тимидина. В смешанной культуре клетки ФПЧ совместно культивировались с ЛПК в присутствии или отсутствии митогенов.

Иммунофенотипический анализ суспензии клеток ФПЧ не выявил зрелых В– и Т–лимфоцитов. Клетки ФПЧ, в отличие от ЛПК взрослых доноров обладали высоким уровнем спонтанной пролиферации в условиях культивирования *in vitro*. Митогены – фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А (Кон–А) подавляли пролиферацию клеток ФПЧ. При совместном культивировании, клетки ФПЧ подавляли как спонтанную, так и митоген–стимулированную пролиферацию ЛПК взрослых доноров, а также пролиферацию ЛПК в двунаправленной смешанной культуре. В работе обсуждаются возможные механизмы действия клеток ФПЧ.

**Ключевые слова:** фетальная печень, иммунология, реакция смешанной культуры лимфоцитов.

### Введение

Реакция иммунной системы реципиента на вводимые клетки аллогенного происхождения является одним из ключевых вопросов клеточной терапии. Если трансплантация клеток взрослого человека, например, клеток костного мозга (КМ), требует проведения тщательного подбора донора и реципиента по антигенам гистосовместимости и возможна, в основном, между близнецами и сиблингами, то способность клеток фетального происхождения индуцировать специфический иммунный ответ до настоящего времени изучена слабо, а имеющиеся данные характеризуются противоречивостью [1, 2, 11, 14]. Очевидно, что иммуногенность клеток зависит от их типа и степени развития. В этой связи интересным объектом исследования являются клетки фетальной печени человека (ФПЧ) – органа, в котором содержатся стволовые кроветворные клетки и их коммитированные потомки различной степени зрелости.

В то же время работ, посвященных изучению влияния клеток ФПЧ на пролиферацию лимфоцитов взрослых доноров *in vitro*, до настоящего времени выполнено чрезвычайно мало [1, 2]. В частности, Ek S. и соавт. [1] не смогли прийти к заключению о влиянии клеток ФПЧ на лимфоциты периферической крови (ЛПК) в смешанной культуре, так как в одних случаях первые стимулировали пролиферацию ЛПК, в других – ингибировали, а в третьих – не вызывали значительного

Human fetal liver is unique as it contains stem hematopoietic cells and their committed derivatives of different maturation. The present study was aimed to assess the amount of immunocompetent human fetal hepatic cells of 9–10 week gestation by phenotypic properties and their reaction to mitogens as well as to evaluate influence of human fetal hepatic cells to proliferation of peripheral blood lymphocytes of adult donors in a mixed culture.

The suspension of human fetal hepatic cells was obtained by a mechanical method using vibration. Cells were cryoconserved under the protection of 5% DMSO at the speed of 1 °C per min. Fluorescent microscopy was used for immune marker analysis. The proliferation activity of fetal hepatic cells and adult peripheral blood lymphocytes was assessed according to <sup>3</sup>H–thymidine inclusion. In the mixed culture human fetal hepatic cells were co–cultured with peripheral blood lymphocytes in the presence or absence of mitogens.

Immune marker analysis of the fetal hepatic cells suspension did not reveal the statistically relevant number of matured B– and T–lymphocytes. Unlike adult peripheral blood lymphocytes human hepatic cells demonstrated high levels of spontaneous proliferation when cultured *in vitro*. Mitogens, phytohemagglutinine (PHA) or concanavalin A (Con–A) suppressed the proliferation of human fetal hepatic cells. In the mixed culture the fetal hepatic cells suppressed both spontaneous and mitogen–stimulated proliferation of adult peripheral blood lymphocytes as well as peripheral lymphocyte proliferation in a two–forked mixed culture. Possible mechanisms of fetal hepatic cells activity have been discussed in the article.

**Key words:** fetal liver, immunology, response of mixed lymphocyte culture.

эффекта. Противоречивые данные, полученные в этой работе, могут быть обусловлены большим диапазоном сроков гестации исследуемых образцов, которые варьировали в пределах от 8 до 20 недель.

В связи с этим в настоящей работе проведено определение содержания иммунокомпетентных клеток в ФПЧ 9–10 недель гестации по фенотипическим свойствам и реакции на митогены, а также исследовано влияние клеток ФПЧ на пролиферацию лимфоцитов периферической крови взрослых доноров при совместном культивировании.

### Материал и методы

Фрагменты печени плодов человека 9–10 недель гестации получали после искусственного прерывания беременности с письменного согласия проинформированных доноров. Суспензию клеток ФПЧ получали в стерильных условиях неферментативным методом с использованием вибрации [3], модифицированным для малых объемов. Полученную клеточную суспензию фильтровали через устройства для переливания кровезаменителей и использовали для дальнейших исследований либо криоконсервировали.

Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева, жизнеспособность до и после криоконсервирования определяли по окрашиванию трипановым синим. Определение α–фетопротеина (АФП) проводили иммуноферментным

методом с помощью набора «Вектор–Бест», Новосибирск, Россия) согласно инструкции производителя на планшетном спектрофотометре Tecan GENios (Австралия).

Для криоконсервирования суспензию клеток разводили до концентрации  $2 \times 10^6$ /мл и по каплям добавляли равный объем криозащитной среды, содержащей 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Суспензию эквilibрировали с криопротектором при 4°C в течение 15 мин., после чего замораживали в контейнере Nalgene Mr. Frosty (Sigma, США) три этапа: до температуры –40°C со скоростью 1°/мин, затем до –80°C со скоростью 10°/мин. Суспензии клеток хранили в жидком азоте не менее 3-х месяцев, а непосредственно перед исследованиями отогревали на водяной бане при 37°C. Для удаления криопротектора суспензии разводили средой культивирования, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (ЭС), и центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Осадок суспендировали в 1 мл среды.

Лимфоциты периферической крови (ЛПК) человека выделяли в градиенте Ficoll–Paque (Pharmacia, Швеция) согласно протоколу [4].

Для проведения фенотипического анализа клетки иммобилизовали на предметном стекле с помощью 10% раствора поли-L-лизина, окрашивали моноклональными антителами и, по мере необходимости, фиксировали 4% раствором параформальдегида. В работе использовали моноклональные антитела к: CD3, CD4, CD8, CD20, CD45, HLF–DR, HLA–ABC. Наблюдение и количественный анализ клеток, меченных вторичными антителами, конъюгированными с FITC, проводили под флуоресцентным микроскопом JenaVal (Karl Zeiss, Йена, Германия).

Для исследования пролиферативной активности клетки суспендировали в среде RPMI–1640, содержащей 10% ЭС, 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина и по  $2 \times 10^5$  клеток помещали в лунки 96-луночного планшета. Клетки культивировали при 37°C, 95% влажности и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 48 часов, после чего в лунки добавляли по 1  $\mu\text{Ci}$  раствора  $^3\text{H}$ -тимидина. Образцы инкубировали в тех же условиях в течение 24 часов. Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток определяли на сцинтилляционном  $\beta$ -спектрометре S–7800 Beckman (США). Данные выражали в импульсах в минуту (имп./мин).

Для определения влияния митогенов на интенсивность пролиферации клеток ФПЧ клетки культивировали с фитогемагглютинином (ФГА, 20 мкг/мл) или конканавалином А (Кон–А, 10 мкг/мл). В некоторых экспериментах пролиферацию клеток ФПЧ ингибировали обработкой митомицином С (МТМ–С) в конечной концентрации 25 мкг/мл, после чего МТМ–С трижды отмывали средой RPMI–1640.

Для постановки смешанной культуры клетки ФПЧ и лимфоциты периферической крови совместно культивировали в соотношении 1:1 в течение 48 часов, после чего в лунки вносили  $^3\text{H}$ -тимидин и определяли интенсивность его включения через 24 часа.

Полученные результаты обрабатывали статистически; в зависимости от характера распределения использовали параметрический метод ( $t$  критерий Стьюдента) или непараметрический – Вилкоксона [5].

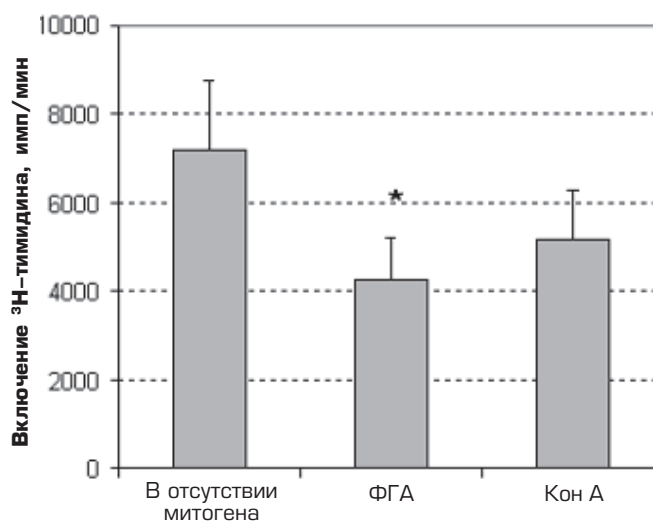
### Результаты и обсуждение

Жизнеспособность свежесыведенной первичной суспензии клеток ФПЧ, оцененная по окрашиванию трипановым синим, составляла  $85 \pm 2\%$ . Иммунофенотипический анализ первичной суспензии не выявил зрелых В- и Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD20). Единственными представителями клеток лимфоидного ряда были CD45 позитивные клетки, количество которых составляло  $2,09 \pm 0,32\%$ . Однако

о зрелости этих клеток сложно судить, учитывая, что CD45 экспрессируется не только на зрелых лимфоцитах, но и на лимфоидно коммитированных клетках, а также на кроветворных клетках–предшественниках [6]. Проведенный анализ не исключает присутствия в суспензии клеток ФПЧ незрелых предшественников Т-лимфоцитов, способных дифференцироваться тимус–независимым путем при культивировании или трансплантации [14].

В связи с этим была предпринята попытка выявить функционально активные Т-лимфоциты в фетальной печени человека при совместном культивировании клеток ФПЧ с митогенами и аллоантигенами. Известно, что фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А (Кон–А) активируют Т-лимфоциты, избирательно связываясь с углеводными компонентами клеточных мембран [7]. В связи с этим, исследовали влияние этих митогенов на включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток ФПЧ (рис. 1).

Из рис.1. видно, что ФГА и Кон–А не только не активировали клетки ФПЧ, но даже подавляли их пролиферацию. При этом ФГА достоверно ( $p < 0,05$ ) ингибировал включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток ФПЧ, тогда как значения, полученные в присутствии этих двух митогенов, достоверно не отличались между собой.



**Примечания:** \* – различия достоверны по сравнению с образцами без митогена

Рис. 1. Влияние митогенов фитогемагглютинаина (ФГА) и конканавалина А (Кон–А) на включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток ФПЧ

В литературе отсутствует единое мнение о действии митогенов на клетки ФПЧ. Наличие антиген–связывающих клеток в ФПЧ было установлено 30 лет назад Roberts I.M. и соавт. [8]. Однако стимуляции клеток ФПЧ в ответ на добавку ФГА в этой работе обнаружить не удалось. Стимулирующий эффект ФГА на клетки ФПЧ человека показан в работе [9]. Однако в этой работе исследовались клетки, полученные из плодов более поздних сроков развития (15–26 недель гестации). В работах [2, 10], проведенных на клетках ФПЧ 8–12 недель гестации, было обнаружено ингибирующее действие митогенов (ФГА или Кон–А) на пролиферацию клеток ФПЧ. Было показано, что в процессе взаимодействия митогена с клетками ФПЧ в среде обнаруживаются факторы, ингибирующие синтез ДНК и подавляющие пролиферацию лимфоцитов, индуцированную аллоантигеном.

Результаты, свидетельствующие об отсутствии фенотипически зрелых и функционально активных Т-лимфоцитов в суспензии клеток ФПЧ 1-го триместра гестации, соответствуют данным работы [11], в которой присутствие фенотипически зрелых Т-лимфоцитов обнаружено в печени человека в более поздние сроки (13–22 недели внутриутробного развития). Предполагают, что предшественники Т-лимфоцитов переселяются в тимус из фетальной печени [6]. Начиная с 8-й недели гестации в фетальном тимусе Т-лимфоциты проходят сложную цепь дифференцировочных событий [12]. В результате этих событий к 13 неделе гестации в кровь поступают зрелые Т-клетки со сформировавшимся TCR (T-cell receptor) комплексом, которые могут колонизировать периферические органы, в том числе и печень.

Наряду с этим, существует мнение, что печень может являться и самостоятельным, тимус-независимым местом развития и созревания Т-клеток [13]. Для выяснения этого вопроса в работе [14] был проведен молекулярный, фенотипический и функциональный анализ клеток ФПЧ. Методом ПЦР с обратной транскриптазой была исследована экспрессия генов, кодирующих цепи TCR. Молекулярный анализ показал, что, несмотря на достаточно раннее (начиная с 7 недели гестации) развитие отдельных цепей, зрелый TCR комплекс окончательно формируется только после 13,5 недель гестации. Транскрипция TCR комплекса увеличивается пропорционально сроку развития плода, но даже в возрасте 16 недель зрелый TCR комплекс был обнаружен только в 6 из 10 исследованных образцов ФПЧ [14]. Кроме того, проведенные в работе [14] исследования показали, что путем направленной дифференцировки в присутствии митогенов, цитокинов и аллоантигенов при культивировании клеток ФПЧ 2-го триместра гестации удается получить зрелые и функционально активные Т-лимфоциты. Однако количество клеток, способных образовывать клоны Т-лимфоцитов, чрезвычайно мало – лишь 2 клетки из  $10^6$  обладали такой способностью. Совокупность наших и литературных данных свидетельствуют в пользу того, что в суспензии клеток ФПЧ 1-го триместра гестации отсутствуют клетки, способные вызывать реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) при трансплантации.

Скорость отторжения клеток после их трансплантации зависит, главным образом, от экспрессии антигенов ГКС класса II. Фенотипический анализ клеток ФПЧ на представленность антигенов ГКС показал, что в суспензии свежее выделенных клеток ФПЧ содержится  $22,3 \pm 5,4\%$  клеток, экспрессирующих HLA-A, B, C (W6/32) и  $7,5 \pm 1,4\%$  клеток, позитивных на HLA-DR. После криоконсервирования содержание клеток, экспрессирующих антигены ГКС класса I и II, не изменялось и составляло  $23,6 \pm 4,1$  и  $6,1 \pm 1,8\%$ , соответственно. Следовательно, клетки, содержащие антигены ГКС, сохраняются в процессе криоконсервирования и должны распознаваться иммунной системой реципиента при введении. Иммунный ответ организма включает активацию Т-лимфоцитов, которая запускает каскад событий, ведущих к отторжению введенных клеток. В системе *in vitro* процесс активации лимфоцитов может быть исследован при совместном культивировании исследуемых клеток с лимфоцитами периферической крови взрослого человека.

В табл. 1 приведены данные по включению  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток ФПЧ и лимфоцитов взрослых доноров. Уровень спонтанной пролиферативной активности свежее выделенных клеток ФПЧ, оцененный по включению  $^3\text{H}$ -тимидина составлял  $7787 \pm 820$  имп./мин. Криоконсервирование приводило к снижению жизнеспособности клеток ФПЧ на 30%. При этом уровень пролиферативной активности также снижался на 30% и составлял  $5344 \pm 694$  имп./мин (см. табл. 1).

Таблица 1. Включение  $^3\text{H}$ -тимидина (имп/мин) в клетки ФПЧ и ЛПК взрослых доноров при раздельном или совместном культивировании (n = 5–8)

Условия эксперимента	Включение $^3\text{H}$ -тимидина, имп/мин/лунку
Клетки ФПЧ	$5344 \pm 694$
Клетки ФПЧ, обработанные МТМ-С	$241 \pm 42$
ЛПК	$1069 \pm 112$
ЛПК <sub>1</sub> + ЛПК <sub>2</sub>	$6548 \pm 285$
ЛПК+ФПЧ	$5421 \pm 582$
ФПЧ <sub>1</sub> + ФПЧ <sub>2</sub>	$4125 \pm 628$

В исследованиях по совместному культивированию использовали криоконсервированные клетки ФПЧ, свободные от вирусной и бактериальной контаминации. Обработка клеток ФПЧ МТМ-С практически полностью подавляла пролиферативную активность.

ЛПК взрослых доноров обладали низкой спонтанной пролиферативной активностью.

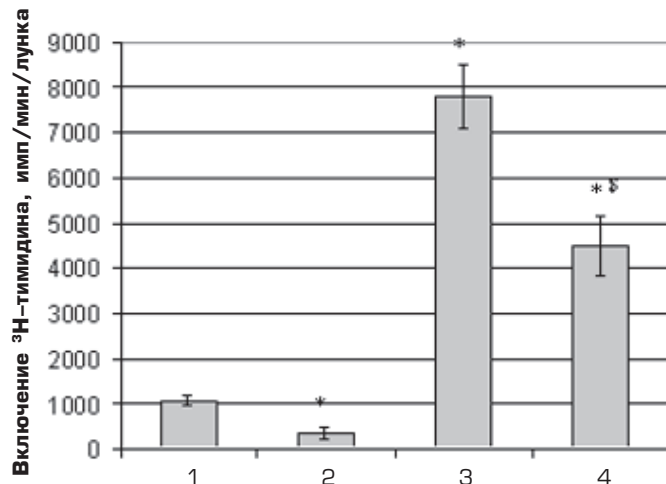
В двусторонней смешанной культуре, при совместном культивировании ЛПК двух различных доноров (ЛПК<sub>1</sub> + ЛПК<sub>2</sub>) уровень включения  $^3\text{H}$ -тимидина составлял  $6548 \pm 285$  имп./мин (см. табл. 1). Эти результаты показывают, что лимфоциты взрослых доноров, использованные в настоящей работе, функционально активны и адекватно реагируют на активацию, стимулированную митогеном и аллогеном.

Напротив, совместное культивирование попарно образцов аллогенных клеток ФПЧ (ФПЧ<sub>1</sub> + ФПЧ<sub>2</sub>) не приводило к стимуляции синтеза ДНК (см. табл. 1). При совместном культивировании клеток ФПЧ и ЛПК были получены значения включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК, значительно превышающие уровень спонтанной пролиферации лимфоцитов (см. табл. 1). Подобный же уровень синтеза ДНК наблюдали при культивировании клеток ФПЧ в отсутствие ЛПК. Поэтому предположили, что он может быть обусловлен пролиферацией фетальных клеток.

Внесение в культуральную среду ФГА (ЛПК+ФГА) приводило к 7–9-кратной стимуляции включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ЛПК (рис. 2). Для исключения вклада спонтанной пролиферации клеток ФПЧ во включение  $^3\text{H}$ -тимидина в смешанной культуре, клетки ФПЧ предварительно обрабатывали митомицином С. После 3-х кратной отмывки митомицином С, совместное культивирование клеток ФПЧ и ЛПК не вызвало стимуляции включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ЛПК. Более того, наблюдалось достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение спонтанной пролиферации ЛПК.

При активации ЛПК митогеном, присутствие клеток ФПЧ также значительно угнетало включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК (см. рис. 2).

Угнетение пролиферации ЛПК клетками ФПЧ может быть обусловлено присутствием в суспензии клеток ФПЧ мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [15, 16]. Установлено [15, 17], что МСК, выделенные из КМ взрослых людей, характеризуются умеренной экспрессией молекул ГКС класса I и слабой экспрессией ГКС класса II. Следовательно, аллогенные лимфоциты узнавали их, но в смешанной культуре этих клеток наблюдали эффект, подобный отмеченному нами – подавление пролиферации лимфоцитов при совместном культивировании [17, 18]. Более того, угнетение иммунного ответа взрослых МСК было подтверждено в условиях *in vivo* у приматов – при трансфузии аллогенных МСК отмечено улучшение приживления аллогенного кожного трансплантата [19].



**Примечания:** \* – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по отношению к ЛПК без добавок (1); \$ – различия достоверны по отношению к группе 3 ( $p < 0,05$ ).

*Рис. 2. Включение <sup>3</sup>H-тимидина в ЛПК взрослого донора в односторонней смешанной культуре:*  
 1 – спонтанная пролиферация ЛПК;  
 2 – смешанная культура ЛПК и клеток ФПЧ, обработанных МТМ-С;  
 3 – пролиферация ЛПК под воздействием ФГА;  
 4 – пролиферация ЛПК под воздействием ФГА в присутствии клеток ФПЧ, обработанных МТМ-С

Недавно в нашей лаборатории из суспензии ФПЧ были выделены претенденты на МСК, которые образовывали колонии фибробластоподобных клеток и были способны дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях [20, 21]. Долевое содержание колониеобразующих клеток в фетальной печени оказалось в 5–7 раз выше, чем в КМ взрослых: одна колониеобразующая клетка приходилась на 30 000–50 000 клеток ФПЧ, в то время как в КМ одна МСК найдена среди 250 000 клеток [22]. Фенотипический анализ, проведенный в работах [21, 22, 23], показал, что мезенхимальные клетки ФПЧ не отличаются от МСК КМ: и те, и другие позитивны по молекулам CD29, CD44, CD166, CD105 и негативны по CD14, CD34, CD45.

Можно предположить, что механизм действия мезенхимальных стволовых клеток обусловлен их способностью продуцировать специфические факторы, способные оказывать иммуносупрессорное действие. Так, на приматах показано, что добавка IL-2 предотвращает ингибирование мезенхимальными клетками митоген-индуцированной активации

лимфоцитов [24]. В недавно проведенной работе [25] было установлено, что действие МСК при трансплантации связано не с дифференцировкой клеток, а с изменением цитокинового профиля в органе-мишени. При этом наблюдали снижение уровня провоспалительных цитокинов и стимуляцию образования противовоспалительных цитокинов и антиапоптотических факторов. В другом исследовании [15] при добавлении к смешанной культуре МСК и Т-лимфоцитов антител против трансформирующего фактора роста-в (TGF- $\beta$ 1) и фактора роста гепатоцитов (HGF) наблюдали вместо угнетающего действия МСК обусловленную ими аллогенную стимуляцию.

В этой связи следует отметить, что вышеуказанные ростовые факторы обнаруживаются в ФПЧ 1-го триместра гестации [26, 27].

Еще одним претендентом на роль супрессора иммунного ответа является  $\alpha$ -фетопротеин (АФП), который не влияет на активность Т- и В-лимфоцитов, но подавляет пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены [28]. Для оценки возможности реализации такого механизма угнетения пролиферации лимфоцитов нами было определено содержание АФП в суспензиях клеток ФПЧ. Было показано, что содержание АФП в суспензии свежеевыделенных клеток ФПЧ составляло  $1044 \pm 205$  МЕ/10<sup>6</sup> клеток. Этот уровень АФП в реакции СКЛ значительно превышает физиологические значения, что и может явиться причиной угнетения пролиферативной активности ЛПК. Следует отметить, что АФП не вырабатывается МСК и может являться дополнительным супрессорным фактором при использовании тотальной суспензии клеток ФПЧ.

### Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в составе ФПЧ 9–10 недель гестации отсутствуют зрелые, функционально активные лимфоидные клетки, способные участвовать в реакциях иммунного ответа. Выявленное в работе свойство клеток ФПЧ подавлять спонтанную и митоген-стимулированную пролиферацию лимфоцитов при совместном культивировании обусловлено, очевидно, присутствием в ФПЧ эмбриоспецифических факторов, способных подавлять иммунный ответ. Отсутствие в составе суспензии клеток ФПЧ иммунокомпетентных клеток, а также способность угнетать реакции иммунного ответа позволяют рассматривать клетки ФПЧ в качестве иммуномодулятора, способного снижать скорость отторжения клеток при трансплантации.

Автор выражает благодарность Павлюку Александру Сергеевичу за помощь в подготовке статьи к опубликованию.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Immunological capacity of human fetal liver cells. *Bone Marrow Transpl.* 1994;14: 9–14.
2. Lindton B., Markling L., Ringden O. Mixed lymphocyte culture of human fetal liver cells. *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2000; 15: 71–8.
3. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Analytical Biochem.* 1991; 194: 325–9.
4. Recktenwald D., Radbruch A. *Cell separation methods and applications* / New York: Marcel Dekker, Inc., 1998: 246.
5. Платонов А.Е. Статистический анализ в биологии и медицине: задачи, терминология, компьютерные методы. 2000; М.: Издательство РАМН: 52.
6. Ярилин А.А. Основы иммунологии. 1999; М.: Медицина: 607.
7. Greaves M., Janossy G., Doenhoff M. Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens. *J. Exp. Med.* 1974; 140: 1–18.
8. Roberts I.M., Whittingham S., Cowling D.C., Mackay I.R. Antigen-binding cells in human fetal liver. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1975; 49: 743–53.
9. Sirianni M.C., Fiorilli M., Casadei A.M., Aiuti F. Response to B and T cell mitogens and surface markers in human fetal lymphoid tissues. *Thymus* 1980; 1: 257–63.

10. Rabinowich H., Bahary C., Ben-Aderet N., Klajman A. Cellular and humoral suppressor activity induced by concanavalin A-stimulated human fetal liver cells. *Transpl.* 1983;35:452–8.

11. Sanchez M.J., Gutierrez-Amos J.C., Fernandez E. Putative prethymic T cell precursors within the early human embryonic liver: a molecular and functional analysis. *J. Exp. Med.* 1993;177: 19–33.

12. Barton F.H., Heinly C.S. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J. Exp. Med.* 1995;181:1445–58.

13. Aguila H.L., Akashi K., Domen J. From stem cells to lymphocytes: biology and transplantation. *Immunol. Rev.* 1997; 157:13–5.

14. Renda M.C., Fecarotta E., Dieli F. et al. Evidence of alloreactive T lymphocytes in fetal liver: implications for fetal hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 2000;25:135–41.

15. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99:3838–43.

16. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98: 2396–402.

17. Young H.E., Steele T.A., Bray R.A. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC class-I. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1999; 221: 63–71.

18. Le Blanc K., Tammik C., Sundberg B. 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.

19. Devine S.M., Bartholomew A.M., Mahmud N. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. Exp. Hematol. 2001; 29: 244–55.

20. Грищенко В.И., Петренко А.Ю., Волкова Н.А., Скоробогатова Н.Г. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток – предшественников из эмбриональной печени человека в условиях *in vitro*. Доповіді НАН України 2005; 2: 138–41.

21. Petrenko Yu.A., Skorobogatova N.G., Jones R.E., Petrenko A.Yu. Cryosensitivity of hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells derived from human fetal liver. Cryobiology 2006; 53: 381–2.

22. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143–7.

23. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001; 98: 2396–402.

24. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. Exp. Hematol. 2002; 30: 42–8.

25. Togel F., Hu Z., Weiss K. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2005; 289: 31–42.

26. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver. Eur. Cytokine Netw. 2001; 12(2): 274–9.

27. Sennikov S.V., Krysov S.V., Silkov A.N. Production of IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 by different populations of erythroid cells derived from human embryonal liver. Cytokine 2002; 17: 221–5.

28. Czokalo M., Wishniewski L. Culture conditions modify the effect exerted by human fetal AFP on some lymphocyte functions *in vitro*. Exp. Pathol. 1981; 20: 233–8.

Поступила 29.04.2007

## Кафедра «Клеточной восстановительной медицины» Российского Государственного Медицинского Университета с 2007 г. начинает подготовку специалистов в области клеточной медицины

Кафедра базируется на базе клиники восстановительной интервенционной неврологии и терапии «НейроВита» при Российском Онкологическом Научном Центре им. Н.Н. Блохина РАМН

### Список лекций ( в циклах)

#### Цикл 1.

1. Банки пуповинной крови в России и за рубежом – история, законодательство, особенности функционирования.
2. Выделение и криоконсервирование гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови (ГСК ПК).
3. Перспективы использования ГСК ПК для терапии негематологических заболеваний на моделях животных.

#### Цикл 2.

1. Понятие ЭСК, их молекулярно-генетические особенности, обеспечивающие самоподдержание и плюрипотентность.
2. Способности ЭСК к дифференцировке *in vitro*, молекулярно-генетические механизмы, обеспечивающие это.
3. Поведение ЭСК *in vivo*, возможности практического применения.

**Адрес: 115478, Москва Каширское шоссе, д. 23, стр. А.**  
**Телефоны для справок: (495) 324-93-39.**