

appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 2000; 95: 3620–7.

7. 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.

8. 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(5): 389–98.

9. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion 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.

10. Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow–derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.* 1999; 5: 309–13.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам *Blood*. Prepublished online May 11, 2006; DOI 10.1182/blood-2005-11-011650

## Иммунное отторжение мезенхимальных стромальных стволовых клеток при трансплантации во взрослый головной мозг

Многочисленные экспериментальные исследования, демонстрирующие высокую пластичность мезенхимальных стромальных стволовых клеток (ММСК), позволили перейти к испытаниям методов клеточной терапии для лечения различных заболеваний, в том числе и в неврологии [1]. Известно, что ММСК в подходящих *in vitro* условиях могут давать презумптивные нейроны [2, 3], приобретая типичный нейрональный фенотип и экспрессируя характерные для нервной ткани маркеры. Поскольку ММСК считаются иммунопривилегированными клетками и обладают иммуносупрессивным эффектом [4], исследователи изучают возможность трансплантации аллогенных клеток с терапевтической целью. Группой Соупе была показана способность аллогенных ММСК к дифференцировке в нейроны *in vivo* при трансплантации в развивающийся головной мозг крыс [5]. Донорские клетки начинали экспрессировать нейрональные маркеры и затем мигрировали в различные удаленные участки головного мозга. Более того, ММСК заселяли обширные участки фетального и неонатального мозга, экспрессируя сайт-специфические нейрональные гены и демонстрируя хорошую выживаемость [5]. Этот эксперимент показывает, что аллогенные ММСК способны к дифференцировке, миграции и длительному выживанию без иммунной реакции в эмбриональном головном мозге.

Недавно в он-лайн версии журнала *Stem Cells* эта же группа исследователей опубликовала новые данные по трансплантации аллогенных ММСК во взрослый, уже сформировавшийся головной мозг. Во взрослом мозге количество факторов, отвечающих за дифференцировку клеток, значительно снижено по сравнению с эмбриональным мозгом. Исследователи предположили, что ММСК, попав в мозг взрослых животных, не будут реализовывать свой потенциал так же успешно, как это происходило у эмбрионов. Однако известно, что и во взрослом мозге есть два региона, обладающих известной пластичностью. Это гиппокампальная зубчатая извилина и вентрикулярная субэпендимальная зона, клетки которых продолжают секретировать морфогенетические белки, отвечающие за пролиферацию, дифференцировку и выживание резидентных клеток–предшественников [6, 7]. Именно в эти области (гиппокамп и стриатум) авторы и выполняли трансплантации. Кроме того, авторы проверили иммуногенность аллогенных ММСК при их трансплантации. Взрослый головной мозг, в отличие от эмбрионального, обладает хорошо развитыми гуморальным и клеточным компонентами иммунной системы, которые могут повлиять на

судьбу донорских клеток.

Оказалось, что в интактном взрослом головном мозге крыс в ответ на инфузию аллогенных ММСК возникает воспалительная реакция, приводящая к быстрому отторжению донорских клеток. Иммунная реакция стала основной преградой на пути выживания и стабильной интеграции в нервную ткань трансплантированных клеток.

Отторжение аллогенной донорской ткани обычно опосредуется адаптивным, или приобретённым, иммунитетом. Адаптивный иммунный ответ возникает на 10–14 сутки после трансплантации, именно столько времени требуется на презентацию антигена, селекцию и клональную экспансию Т-клеточных популяций. При гистологических исследованиях тканей, полученных от экспериментальных животных, было обнаружено, что в данном случае задействуется не приобретённый иммунитет. В области трансплантата присутствовало минимальное количество CD8<sup>+</sup> цитотоксических клеток, к тому же отторжение завершилось уже к седьмым суткам от начала эксперимента. Это свидетельствует о том, что ММСК отторгались посредством воспалительной реакции, то есть реакции врождённого иммунитета. В ней главным образом участвовали клетки микроглии (специализированные макрофаги). Обычно при травмах мозга микроглиальные клетки быстро мигрируют в зону повреждения и формируют своеобразный барьер, отделяющий нормальные клетки от разрушенных. При трансплантации ММСК наблюдался сходный эффект.

Интрацеребральная трансплантация вызывает серьёзную механическую травму мозга, поскольку продвижение канюли через мозговую паренхиму ранит локальные нервные и сосудистые структуры, что, по-видимому, и провоцирует воспаление. Уже на третьи сутки вокруг донорских клеток начиналось быстрое развитие клеток микроглии – как в стриатуме, так и в гиппокампе. На седьмые сутки фибронектин–реактивный матрикс и макрофаги формировали вокруг ММСК барьер. Сходным образом отторгались и трансплантированные в мозг эндотелиальные клетки. В то же время фетальные нейральные трансплантаты вызывали иммунный ответ, опосредованный в основном Т-клетками, и отторгались в течение 3 недель. Это указывает на то, что характер иммунной реакции контролируется характеристиками донорских клеток.

ММСК и эндотелиальные клетки продуцируют гранулоцитарно–макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ–КСФ) и другие цитокины, усиливающие пролиферацию и созревание гранулоцитов и макрофагов и, соответственно,

микроглиальных элементов. Более того, ММСК экспрессируют молекулу SDF-1, которая служит фактором хемотаксиса для клеток миелоидного ряда. Возможно, именно экспрессия этих факторов *in situ* приводит к пост-операционному воспалению и разрушению трансплантатов.

Хотя гистологические и иммуногистохимические данные (клетки выявлялись антителами к GFP) свидетельствовали о полном отторжении трансплантата, в нервной ткани были обнаружены BrdU и BBZ (другие 2 метки ММСК), что позволяло предположить выживание части ММСК и их созревание. Оказалось, что при трансплантации ММСК в сформированный мозг происходит перенос их маркеров в клетки хозяина. В качестве контроля были использованы нежизнеспособные ММСК, прошедшие несколько циклов быстрой заморозки-разморозки, либо подвергнутые микроволновому облучению, а затем трансплантированные в гиппокамп и стриатум интактных крыс. И, действительно, в течение 12 недель после трансплантации меченные BrdU и BBZ клетки широко распространились по обоим регионам трансплантации. Их фенотипические характеристики полностью соответствовали характеристикам клеток, обнаруженных после трансплантации жизнеспособных ММСК – это были нейроны реципиента. Таким образом, происходил перенос маркеров из трансплантированных ММСК в клетки-предшественники нейронов хозяина, которые в дальнейшем дифференцировались. И хотя стриатум, в отличие от гиппокампа, не явля-

ется нейрогенной областью, в последнее время появились данные об отдельных прогениторных клетках, присутствующих в нём. Возможно, именно с этим связана схожесть картин в обоих районах трансплантации.

Таким образом, это исследование противоречит как данным о пластичности ММСК при их инфузиях в интактный либо повреждённый мозг, а также данным об их иммунопривилегированности. Возможно, в ранних экспериментах исследователи ошибочно определяли выживание и пластичность ММСК, основываясь на обнаружении в тканях реципиента маркеров BrdU и BBZ. На самом деле, при трансплантации аллогенные ММСК отторгаются посредством воспалительной реакции, в которой участвуют клетки микроглии реципиента, а маркеры остаются в тканях в результате переноса. Явление переноса маркеров отрицает феномен трансдифференцировки ММСК *in vivo* в условиях подходящего микроокружения. Результаты этого исследования ставят под сомнение перспективу использования аллогенных ММСК в качестве источника нейронов при трансплантациях нервной ткани, а также авторы статьи призывают к осторожности при дальнейшем использовании BrdU и BBZ в качестве маркеров трансплантированных мезенхимных стволовых клеток. Вместе с тем, использование этих маркеров может быть причиной артефактов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* 2005; 57(6): 874–82.
2. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 2000; 61(4): 364–70.
3. 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(2): 247–56.
4. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мультипотентных

мезенхимных стромальных клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2005; 2: 39–42.

5. Munoz-Elias G., Marcus A.J., Coyne T.M. et al. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J. Neurosci.* 2004; 24(19): 4585–95.
6. Doetsch F., Caille J., Lim D.A. et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97(6): 703–16.
7. Gage F.H., Kempermann G., Palmer T.D. et al. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 1998; 36(2): 249–66.

Подготовила А.С. Григорян  
По материалам *Stem Cells* Published online July 27, 2006

## Первое потомство, полученное с использованием «искусственных» сперматозоидов, выделенных из эмбриональных стволовых клеток

Эксперименты по выделению и характеристике половых клеток из эмбриональных стволовых (ЭСК) позволят исследовать биологические процессы в гаметех и гамето-генез, а также стать одним из способов лечения бесплодия в будущем [1]. До недавнего времени было показано формирование из ЭСК овоцитов [2] и сперматозоидов [3, 4]. Однако ни одна группа до сих пор не показала функциональность выделенных гамет, то есть их способность давать нормальное потомство. Полученные путем оплодотворения «искусственными» гаметами blastocисты не имплантировали животным.

Недавно группа Karim Nayernia из Georg-August University (Göttingen, Germany) впервые показала способность сперматозоидов, выделенных из ЭСК мыши, к оплодотворению и развитию взрослых животных из полученных зародышей. Работа опубликована в журнале *Developmental Cell*.

Для определения функциональной активности полученных клеток ученые использовали две генетические конструкции с промоторами генов, характерных для премейотических гаплоидных мужских половых клеток. Под их контролем запускалась экспрессия флуоресцентных белков – зеленого и красного соответственно. Благодаря таким генетическим меткам, исследователи могли выделить сперматогонимальные клетки в культуре ЭСК. Эти гены вносили в ЭСК в культуру и культивировали до 2 месяцев. В процессе культивирования использовался коктейль растворимых факторов, которые способствовали выживанию и самообновлению мышинных половых клеток. После культивирования в такой среде до 60% клеток, экспрессирующих трансген (а значит, коммитированных по пути развития мужских половых клеток), сортировались и переносились в базовую среду без факторов дифференцировки. Через два месяца клетки подвергали