

генотипа и кариотипа линий ЭСКч [5]. Весь набор методов, применяемых в предшествующих работах, не позволяет комплексно и глубоко оценить изменения клеток [1–3]. Поскольку этой международной группой были проанализированы линии из разных источников (из разных стран), исследование можно считать независимым и законченным.

Результаты предполагают применение универсального подхода сканирования клеточных геномов при помощи генных чипов. Основная заслуга в распространении такого подхода, безусловно, принадлежит компании Affymetrix, применение чипов которой становится своеобразным стандартом в клеточной и молекулярной биологии [5].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Brimble S.N., Zeng X., Weiler D.A. et al. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev.* 2004; 13: 585–97.
2. Buzzard J.J., Gough N.M., Crook J.M., Colman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 381–2.

Таким образом, линии ЭСКч, поддерживаемые *in vitro* длительное время, подвержены генетическим и эпигенетическим изменениям, а значит, нуждаются в тщательном геномном мониторинге как во время культивирования, так и в детальном анализе при использовании *in vivo* и тем более в клинических целях. Тем не менее, приведенные данные не дают информации о причинах генных aberrаций. Авторы статьи призывают к более внимательному исследованию карио- и генотипа ЭСК на поздних пассажах. Применение линий ЭСК для модельных фармакологических экспериментов, преclinical и клинических испытаний в будущем, предполагает использование для этих целей клеток, прошедших минимальное количество пассажей в культуре.

3. Rosler E.S., Fisk G.J., Ares X. et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* 2004; 229: 259–74.
4. Draper J.S., Smith K., Gokhale P. et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 53–4.
5. Matsuzaki H., Dong S., Loi H. et al. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat. Methods* 2004; 1: 109–11.

Подготовила В.С. Мелихова
по материалам *Nat. Genet. AOP*; 4 September 2005;
doi:10.1038/ng1631.

Иммуногенность эмбриональных стволовых клеток – реакция отторжения при аллогенной трансплантации

Степень иммунной реакции реципиента на вводимые эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и их дериваты является одним из ключевых вопросов, ответ на который определит будущие возможности и особенности их применения в медицине. В настоящее время существуют значительные противоречия во взглядах на способность ЭСК индуцировать специфический иммунный ответ. Исследовано наличие ключевых молекул на поверхности ЭСК, ответственных за взаимодействие с клетками иммунной системы. Было показано, что для ЭСК характерна низкая степень экспрессии антигенов МНС-I и отсутствие экспрессии антигенов МНС-II [1, 2]. Таким образом, ЭСК, как и все другие клетки, экспрессирующие МНС-I, должны распознаваться и уничтожаться аллогенными Т-лимфоцитами в реакции отторжения [3]. С другой стороны, показано, что ЭСК не стимулируют аллогенные Т-лимфоциты в кокультуре и, более того, ингибируют их пролиферацию в смешанной реакции лимфоцитов [1]. Ингибирующий эффект пропорционален количеству ЭСК и, в целом, имеет сходные черты с иммуномодулирующими эффектами костномозговых стромальных/мезенхимальных стволовых клеток [4]. Описанный феномен позволил предположить иммунопривилегированный статус ЭСК, в том числе и при их трансплантации аллогенному реципиенту.

Необходимо отметить, что иммуногенность ЭСК изучалась, главным образом, в опытах *in vitro*, и представления о характере взаимодействия ЭСК с иммунной системой реципиента до недавнего времени оставались лишь результатом умозаключений. Недавно группа Kofidis T. исследовала иммунологические аспекты трансплантации ЭСК в опытах *in vivo*. Авторы не изучали иммуногенность предифференцированных производных ЭСК.

Мышинные ЭСК, меченые маркерным геном GFP, инъекцировались интрамиокардиально в зону инфаркта, полученную

в результате предварительной перевязки коронарной артерии. Трансплантация производилась трем группам животных: группа 1 – аллогенные животные, 2 – сингенные мыши (контроль), группа 3 – мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Оценка иммунного ответа реципиентов производилась в разные сроки посттрансплантационного периода (1-я, 2-я и 4-я недели). Гистологическими и иммуногистохимическими исследованиями окружающих тканей сердца определялись характер экспрессии молекул МНС, степень инфильтрации лейкоцитами и оценка клеточного состава инфильтрата.

Схема этой части эксперимента представлена на рисунке. Через 2 недели после трансплантации у всех животных сформировались большие инфильтраты в области введения клеточных трансплантатов, размер которых несколько уменьшался к 4-й неделе. На 4-й неделе посттрансплантационного периода имели место выраженная клеточная дисплазия и ядерный полиморфизм, тем не менее, классической тератомы на данном сроке не наблюдалось. Иммуногистохимическое исследование показало наличие множества Т-лимфоцитов и дендритных клеток (ДК) вокруг и внутри инфильтрата у мышей другой линии (аллогенная трансплантация), их незначительное количество имелось у сингенных мышей и полное отсутствие наблюдалось у SCID-мышей. Т-лимфоциты концентрировались вокруг трансплантата, тогда как ДК располагались, главным образом, внутри него. Часть ДК аллогенной группы животных имела донорское происхождение. Количество клеток исследуемых популяций у аллогенных мышей прогрессивно возрастало от 1-й к 4-й неделям. Экспрессия молекул МНС I класса клетками донора наблюдалась у всех групп животных. При аллогенной трансплантации она была максимально высока на 1-й неделе, значительно возрастала ко 2-й и затем снижалась к 4-й неделе посттрансплантационного периода. Экспрессия

молекул МНС II класса клетками донора наблюдалась только у аллогенной группы мышей. В этой же группе обнаруживали выраженный гуморальный ответ в виде аллоантител, титр которых возрастал к 4-й неделе.

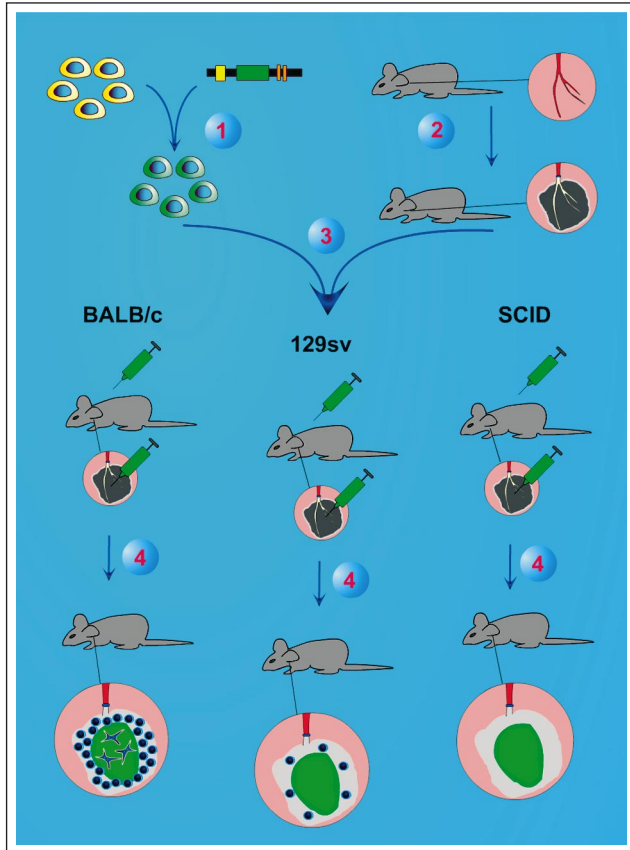


Схема эксперимента:

1 – трансфекция ЭСК мыши линии 129sv вектором pEF-1 a-EGFP с получением колонии, экспрессирующей GFP; 2 – перевязка крупного артериального ствола сердца (left anterior descending artery) мышей с последующим получением экспериментального инфаркта миокарда; 3 – трансплантация трансфицированных ЭСК в область инфаркта миокарда трем линиям мышей (группа 1 – аллогенные мыши линии BALB/c, группа 2 – сингенные мыши линии 129sv, группа 3 – мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом – SCID); 4 – гистологическое и гистохимическое исследование тканей сердца на 2-й неделе посттрансплантационного периода (мышы первой группы – выраженная инфильтрация Т-лимфоцитами и дендритными клетками, мышы второй группы – единичные лимфоциты в пограничных с инфарктом зонах миокарда, мышы третьей группы – полное отсутствие лимфоцитов и дендритных клеток).

Анализ продукции цитокинов реактивными Т-лимфоцитами селезенки показал существенное возрастание IL-2 и INF- γ у аллогенной группы мышей к 4-й неделе посттрансплантационного периода в сравнении с животными контрольной группы.

Таким образом, мышинные ЭСК, трансплантированные аллогенному реципиенту, инициируют выраженное и прогрессирующее иммунное отторжение. Ответ хозяина на введенные клетки осуществляется посредством клеточных и гуморальных реакций. Реакции клеточного иммунитета реализуются через инфильтрацию клеточного транспланта-

та и окружающих тканей Т-лимфоцитами и дендритными клетками. Реакции гуморального иммунитета осуществляются посредством выработки специфических к антигенам трансплантированных клеток антител. В спектре цитокинов, секретируемых реактивными лимфоцитами селезенки, преобладают IL-2 и INF- γ , что свидетельствует о преобладании реакций клеточного иммунитета (Th-1 тип). В целом, несмотря на отсутствие прямых доказательств наличия алло-реактивных Т-лимфоцитов, наблюдаемая картина соответствует стандартной динамике «острого отторжения» аллотрансплантата, обусловленного первичной активацией Т-клеток [5].

Уменьшение размеров зоны занятой клеточным трансплантатом к 4-й неделе посттрансплантационного периода наблюдалось и в других группах животных, что свидетельствует о наличии неиммунных механизмов гибели клеток. Так как в данных экспериментах ЭСК вводились в зону инфаркта, полученного путем перевязки крупного артериального ствола, такая гибель клеток вполне может быть обусловлена ишемическим повреждением.

Инициация иммунных реакций у аллогенной группы мышей показанная в работе, не вызывает сомнений. Поэтому концепция иммунопривилегированности ЭСК не подтверждается в опытах *in vivo*. Тем не менее, по-видимому, ЭСК, их коммитированные производные и клетки взрослого животного могут значительно различаться по способности индуцировать иммунный ответ реципиента.

Максимальная выраженность проявлений иммунного ответа определялась на 2–4-й неделях посттрансплантационного периода. На эти же сроки приходится максимальная выраженность экспрессии донорскими клетками молекул МНС I класса и маркеров дифференцировки по направлению к органоспецифическим клеткам-предшественникам. На основании совпадения этих позиций авторы предполагают, что недифференцированные ЭСК должны быть менее иммуногенны, чем их предифференцированные производные. С другой стороны, такое совпадение может быть случайным, и динамика иммунного ответа может не зависеть от вышеперечисленных факторов.

Авторы не сравнивали степень иммуногенности недифференцированных ЭСК, их предифференцированных производных и клеток взрослых животных. Подобное сравнение с клетками человека проведено группой Drukker в опытах *in vivo* [7]. Этой группой было показано, что дифференцированные/предифференцированные производные ЭСК менее иммуногенны, чем клетки взрослого человека [7]. Исследования Kofidis et al. и Drukker et al. значительно отличаются друг от друга, поэтому изучение иммуногенности производных ЭСК *in vivo* будет являться предметом будущих исследований.

Таким образом, недифференцированные ЭСК способны стимулировать реакцию «хозяин против трансплантата» при введении иммунологически несовместимому (аллогенному) реципиенту. Основным механизмом реакции отторжения является активация Т-лимфоцитов. Имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные позволяют предположить меньшую иммуногенность недифференцированных/предифференцированных ЭСК в сравнении с клетками взрослого организма. Важным направлением будущих экспериментов станет исследование способности коммитированных производных ЭСК индуцировать иммунный ответ, так как именно они являются наиболее перспективным клеточным материалом для трансплантаций. Кроме того, в настоящий момент обсуждаются разные стратегии обхода трансплантационного барьера при введении несовместимых ЭСК [8, 9].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Majumdar A., Ferber I., Lebkowski J. et al. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* 2004; 22: 448–56.
2. Drukker M., Katz G., Urbach A. et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *PNAS* 2002; 99: 9864–9.
3. Zavazava N., Kabelitz D. Alloreactivity and apoptosis in graft rejection and transplantation tolerance. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68: 167–74.
4. Сергеев В.С. Иммунологические свойства стромальных/мезенхимальных стволовых клеток. [http://celltranspl.ru/journal/publications/?MESSAGES\[1\]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=803](http://celltranspl.ru/journal/publications/?MESSAGES[1]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=803).
5. Halloran P.F., Brosky A.P., Batiuk T.D. et al. The molecular immunology of

acute rejection: an overview. *Transplant. Immunol.* 1993; 1: 2–27.

6. Merad M., Hoffmann P., Ranheim E. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 2004; 10: 510–7.

7. Drukker M., Katchman H., Katz G. et al. Human embryonic cells and their differentiated derivatives are less susceptible for immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 2005; 18 Epub.

8. Drukker M., Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends in Biotechnol.* 2004; 22: 136–41.

9. Bradley J., Bolton E., Pedersen R. Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 859–71.

Подготовил В.С. Сергеев
по материалам *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2005; 28: 461–466

Эмбриональная стволовая клетка обладает способностью репрограммировать ядро взрослой соматической клетки

Принято считать, что только цитоплазма яйцеклетки обладает уникальной способностью репрограммировать ядро взрослой соматической клетки при его переносе. Причём этот механизм универсален для многих видов млекопитающих, включая человека. Этот биологический феномен широко используется для создания клонированных организмов и индивидуальных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Однако, механизмы этого феномена, реализующегося посредством цитоплазматических факторов ооцита, остаются неизученными [1, 2].

Лаборатория Kevin Eggan из Harvard Stem Cell Institute изучает возможности репрограммирования ядра соматической клетки в ЭСК. При получении положительного результата на человеческом материале технология может заменить существующую – перенос ядра соматической клетки (ПЯСК) в энуклеированный ооцит с целью создания индивидуальных линий ЭСК (так называемого терапевтического клонирования). Последняя подразумевает использование донорских яйцеклеток и искусственное создание эмбриона, который уничтожается после выделения ЭСК. Широкое использование подобной технологии в регенеративной медицине вызывает неоднозначные этические мнения в обществе, протесты религиозных деятелей и запреты ПЯСК человека в ряде стран мира.

Если технология, предлагаемая Kevin Eggan, действительно дает положительные результаты с человеческим материалом, то её применение поможет избежать этических проблем, поскольку она не связана с созданием эмбрионов и использованием донорских яйцеклеток. Предшествующие эксперименты на мышах показали перспективность такого подхода [3, 4]. Первые результаты работы, выполненные Cowan Chad из лаборатории Eggan, были опубликованы в журнале *Science*. Ниже представлены основные выводы из нее.

1. *In vitro* модель, созданная исследователями, может быть применена для изучения этого феномена. Схема эксперимента представлена на рисунке.

В работе использовали фибробласт кожи человека и линию ЭСК. Оба вида клеток генетически метили и выполняли химически индуцированное слияние. За счёт генетических меток производили селекцию клеток-гибридов и изучали их свойства.

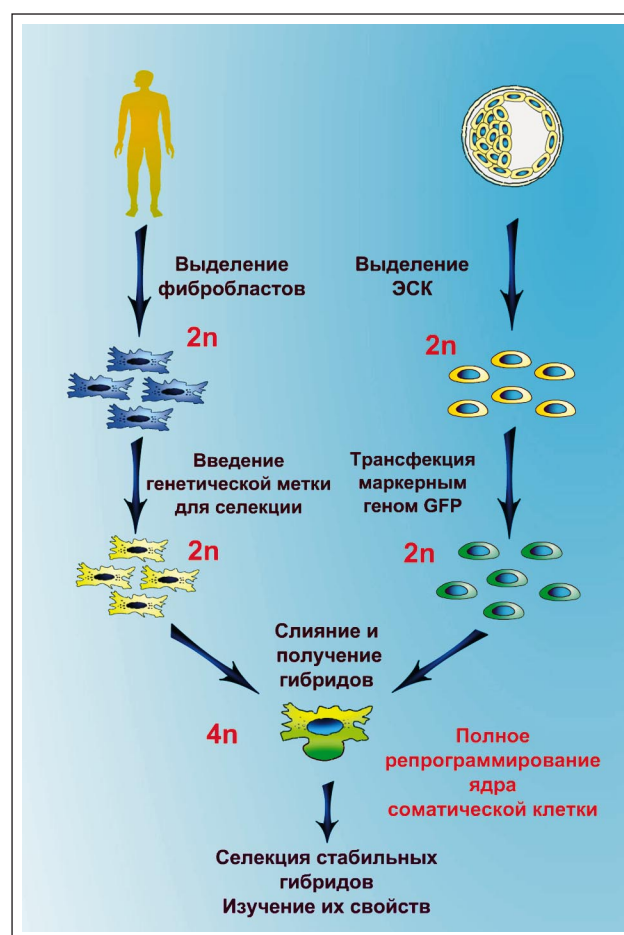


Схема эксперимента