

УДК 571.27

Биоинженерия искусственных лимфоидных органов

М. А. Носенко^{1,2,3*}, М. С. Друцкая¹, М. М. Мойсенович², С. А. Недоспасов^{1,2,3}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³Немецкий научно-исследовательский центр ревматологии, 10117, Берлин, Шаритеплатц, 1, Германия

*E-mail: maxim-nosenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.09.2015

РЕФЕРАТ Обзор посвящен проблеме конструирования искусственных лимфоидных органов. Успех в этой области позволит не только лучше понять механизмы функционирования нормальных органов иммунной системы, но и разработать новые подходы к терапии иммунодефицитов, аутоиммунных состояний и, возможно, других заболеваний. На примере лимфатического узла мыши рассмотрено строение и развитие нормальных лимфоидных органов. Особое внимание уделено роли межклеточных взаимодействий и цитокиновых сигналов в механизмах формирования и функционирования лимфоидных органов. Описаны биоматериалы, на основе которых возможно создание искусственных органов, в том числе органов иммунной системы. Критически рассмотрены достижения последних лет в области биоинженерии искусственных лимфоидных органов и предполагаемые направления исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоинженерия, искусственный лимфоидный орган, полимерный матрикс, стромальные клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АГ – антиген; ДК – дендритные клетки; КВЭВ – клетки высокого эндотелия венул; КЭК – кровеносные эндотелиальные клетки; ЛЭК – лимфатические эндотелиальные клетки; МФ – макрофаг; МЭФ – мышечные эмбриональные фибробласты; РК – ретиноевая кислота; РКМЗ – ретикулярные клетки маргинальной зоны; СКК – стволовые кроветворные клетки; СФ – сфингозин-1-фосфат; T_{ФХ} – T-фолликулярные хелперы; ТЭК – тимусные эпителиальные клетки; ФДК – фолликулярные дендритные клетки; ФРК – фибробластные ретикулярные клетки; iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; LTiC (lymphoid tissue inducer cells) – клетки-индукторы лимфоидной ткани; LToC (lymphoid tissue organizer cells) – клетки-организаторы лимфоидной ткани.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большой интерес вызывают биоинженерные технологии, позволяющие по-новому подойти к решению современных научных и прикладных задач биологии и медицины. Создание искусственных биосовместимых материалов открывает широкие перспективы для регенеративной медицины, трансплантологии, лечения инфекционных и онкологических заболеваний, а также для фундаментальных исследований ряда важных аспектов тканевой организации живых организмов, когда необходимо сохранить пространственную структуру изучаемого объекта. Разработан достаточно широкий спектр биотехнологических материалов, которые биосовместимы, нетоксичны и позволяют поддерживать функции различных клеток в трехмерном пространстве. Кроме того, возможна «функционализация» этих

биоматериалов, в частности, каркасов или матриксов, о которых речь пойдет далее, в зависимости от конкретной задачи. Это послужило заделом для создания искусственных органов и тканей на основе полимерных каркасов, в том числе искусственных костей [1–4], кожи [5, 6], сердечной ткани [7], а также других тканей и органов. Особое внимание привлекает перспектива получения функциональных искусственных лимфоидных органов, главным образом вторичных или третичных, таких, как лимфоузлы и лимфоидные фолликулы [8–10]. Этот интерес обусловлен возможностью применения подобных структур для коррекции иммунодефицитных состояний и терапии аутоиммунных, инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований. Предполагается, что биоинженерные иммунные органы будут частично или полностью выполнять защитные функции

в организме человека при патологических состояниях [10]. Функциональные искусственные вторичные лимфоидные органы (например, искусственные лимфоузлы) позволяют изучать и моделировать не до конца понятые стороны иммунного ответа, а в будущем найти применение при иммунотерапии целого ряда заболеваний. Важным отличием новых способов иммуномодуляции от распространенных сейчас системных подходов (например, системной цитокиновой или антицитокиновой терапии, деплеции популяций лимфоцитов и т.д.) является воздействие на уровне распознавания иммунной системой специфических антигенов, что позволит минимизировать негативные последствия системной иммунотерапии и максимально сконцентрировать действие на причине заболевания. При этом преимущество по сравнению с классической вакцинацией заключается в создании и длительном поддержании наиболее благоприятного микроокружения, обеспечивающего все ключевые клеточные взаимодействия, вовлеченные в иммунный ответ. Во многих случаях это обстоятельство является решающим фактором успешной терапии [11, 12].

СТРУКТУРА ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Лимфоидные органы – неотъемлемая структурная часть иммунной системы, нарушения в работе которой могут приводить к иммунодефицитам у человека и животных [13, 14]. Выделяют три группы таких органов: первичные, вторичные и третичные. Первичные и вторичные лимфоидные органы в нормальном взрослом организме присутствуют постоянно, тогда как третичные образуются локально в месте возникновения сильной и длительной иммунной реакции, например в области раковой опухоли или хронического воспаления [15]. Первичные лимфоидные органы, тимус и костный мозг, выполняют функцию генерации клеток иммунной системы, а также формирования репертуара рецепторов Т- и В-лимфоцитов, тогда как вторичные и третичные обеспечивают их выживание, взаимодействие с другими клетками, связь врожденного и адаптивного звеньев иммунного ответа, а также активацию и поддержание иммунного ответа. Соответственно моделирование различных лимфоидных органов позволит решить разнообразные проблемы как фундаментальной науки, так и медицины.

Функциональность иммунных органов обеспечивается их уникальной микроархитектурой, разнообразием типов вовлеченных клеток и факторов, воспроизведение которых в модельных системах и представляет основную задачу биоинженерии, так как без правильной организации всех компонентов невозможна их функциональная активность.

Понимание механизмов организации клеток в естественных органах необходимо для построения их искусственных аналогов.

Для всех иммунных органов характерно наличие стромы, часто состоящей из нескольких типов клеток, эндотелиального, мезенхимального, а в некоторых случаях эпидермального происхождения [16, 17]. К основным функциям стромы относятся привлечение и пространственная организация в органе иммунных клеток, поддержание их жизнеспособности, пролиферации, создание условий для эффективного взаимодействия с антигенами и другими клетками. Каждый орган имеет определенный тип стромы, необходимый для функционирования данного органа. В костном мозге взрослого организма из стволовых кроветворных клеток (СКК) и кроветворных клеток-предшественников образуются все гемопоэтические клетки, в том числе лейкоциты всех типов. Для поддержания СКК в костном мозге существуют специальные ниши, обеспечивающие длительную репопуляцию СКК, их дифференцировку в кроветворные клетки-предшественники и генерацию всех необходимых ростков дифференцировки [18, 19]. Помимо этого, костный мозг выполняет важную роль в дифференцировке и реализации функции В-лимфоцитов, клеток памяти, плазматических и других иммунных клеток, что обеспечивается определенными стромальными клетками костного мозга [20].

Многие типы гемопоэтических клеток полностью или практически полностью созревают в костном мозге. Однако предшественники Т-лимфоцитов должны дополнительно пройти несколько этапов созревания в тимусе. Строма тимуса – тимусные эпителиальные клетки (ТЭК) – обеспечивает выживание и селекцию тимоцитов, при этом разные субпопуляции ТЭК помогают осуществить положительную или отрицательную селекцию [21]. При отрицательной селекции большую роль играют ассоциированные со стромой дендритные клетки, активно представляющие аутоантигены [22]. Также в тимусе важен мезенхимальный компартмент, роль которого заключается в поддержании функционирования как эпителиальных, так и гемопоэтических клеток. Во всех этих процессах важная роль отводится многочисленным взаимодействиям между гемопоэтическими, мезенхимальными и эпителиальными клетками [23]. Строма способствует выходу из тимуса «обученных» зрелых Т-лимфоцитов, способных к распознаванию широчайшего репертуара чужеродных антигенов в контексте молекул МНС и при этом наименее агрессивных к собственным антигенам организма [16, 24].

В лимфоузлах, белой пульпе селезенки и других вторичных и третичных лимфоидных органах

стромальные клетки привлекают зрелые иммунные клетки и обеспечивают презентацию антигенов и активацию Т- и В-лимфоцитов, приводящую к их дальнейшей дифференцировке, пролиферации и выполнению эффекторных функций, а также к формированию клеток памяти [25–27]. Особую роль играют лимфоидные органы, ассоциированные с кишечником – брыжеечные лимфоузлы, Пейеровы бляшки, изолированные лимфоидные фолликулы и криптотатчи [28]. Они участвуют в регуляции взаимоотношений организма с симбиотической микрофлорой, формировании толерантности к непатогенным бактериям и пищевым антигенам и ответа против патогенных микроорганизмов [29–31].

Особое значение для биоинженерии искусственных лимфоидных органов имеют вторичные и третичные иммунные органы, так как они являются центральным звеном в запуске адаптивного иммунного ответа [26], а потому происходящие в них процессы представляют большой интерес как для изучения, так и для возможного клинического вмешательства при различных патологических состояниях. В связи с этим структура и развитие этих органов будут рассмотрены более подробно на примере лимфатических узлов. На *рис. 1* приведена схема строения типичного лимфатического узла, и показаны основные этапы формирования в нем адаптивного иммунного ответа.

Анатомически лимфоузлы представляют собой капсулированные органы бобовидной формы, соединенные сосудами с кровеносной и лимфатической системами. По расположению в организме выделяют две основные группы лимфоузлов: брыжеечные, участвующие в формировании иммунного ответа и толерантности к антигенам в кишечнике, и периферические, собирающие лимфу от различных отделов тела, преимущественно из барьерных тканей. Такое разделение объясняется не только анатомическим расположением, но и функциональными различиями, так как эти две группы органов имеют разное происхождение и функции [32–35]. Среди периферических лимфоузлов отдельно выделяют также шейные из-за особенностей их образования в эмбриогенезе и участия в иммунитете слизистых [36, 37]. Несмотря на различия в происхождении и функциях, анатомическая структура всех лимфоузлов довольно сходна и представлена двумя основными отделами: кортексом, образующим основную паренхиму органа, и медуллой, которая сообщается с афферентными лимфатическими сосудами, несущими лимфу из органа [38]. Область кортекса, граничащая с медуллой, называется паракортексом. Снаружи лимфатический узел покрыт капсулой, через которую орган сообщается с афферентными лимфатическими сосудами. От капсулы внутрь органа отходят соеди-

нительнотканые перегородки (трабекулы), идущие вплоть до медуллярного синуса, образующего ворота лимфоузла [39]. Область между капсулой и кортексом называется субкапсулярным пространством.

Кровеносные сосуды соединены с органом через ворота, далее они идут в паракортекс, называемый также Т-зоной, где формируется сеть капилляров. В кортексе лимфоузла располагаются лимфоидные фолликулы, которые также называются В-зонами [38]. Название зон связано с расположением и функцией этих двух основных групп лимфоцитов в лимфоузле, хотя и не отражает многих нюансов клеточных перемещений и взаимодействий, установленных только в последние годы (благодаря развитию технологий, позволяющих проводить прижизненную визуализацию отдельных клеток в органах и тканях [40]). В-лимфоциты преимущественно находятся и функционируют в В-зонах, тогда как Т-клетки в основном располагаются в паракортексе за исключением фолликулярных хелперных лимфоцитов, играющих важную роль в работе В-лимфоцитов [41]. Наличие отдельных В- и Т-зон лимфатических узлов возможно благодаря формированию в них специального микроокружения, продуцирующего как факторы выживания лимфоцитов, так и «гомеостатические» хемокины (так, для В-зон основными факторами являются цитокины BAFF, CXCL13, для Т-зон – IL-7, CCL21, CCL19) [25, 42–44]. Эти молекулы синтезируются, в основном, стромальными клетками лимфоузлов, а также другими типами клеток, в том числе эндотелиальными и дендритными [42]. В В-зонах присутствуют фолликулярные дендритные клетки, участвующие в созревании В-лимфоцитов и имеющие мезенхимальное происхождение [45], а в Т-зонах – дендритные клетки гемопоэтического происхождения, участвующие в презентации антигенов Т-лимфоцитам [46]. Дендритные клетки гемопоэтического происхождения в основном приходят с афферентной лимфой из различных участков тела, главным образом, из барьерных тканей, где они встретили антиген, активировались и начали экспрессировать хемокиновый рецептор CCR7, ответственный за их перемещение в Т-зоны лимфоузлов. Существуют также резидентные дендритные клетки лимфоузлов, постоянно находящиеся в органе [47]. Их роль заключается в поглощении и презентации антигенов непосредственно из лимфатической жидкости, поступающей в лимфоузел по системе специальных каналов – кондуитов. Эти каналы образованы разветвленной сетью полимеров, включая коллаген I, II, IV, ламинин, фибронектин, ER-TR7 и др. [48].

Лимфоциты постоянно рециркулируют в организме, периодически нанося визиты в различные лимфоузлы под воздействием привлекающих их хемокинов.

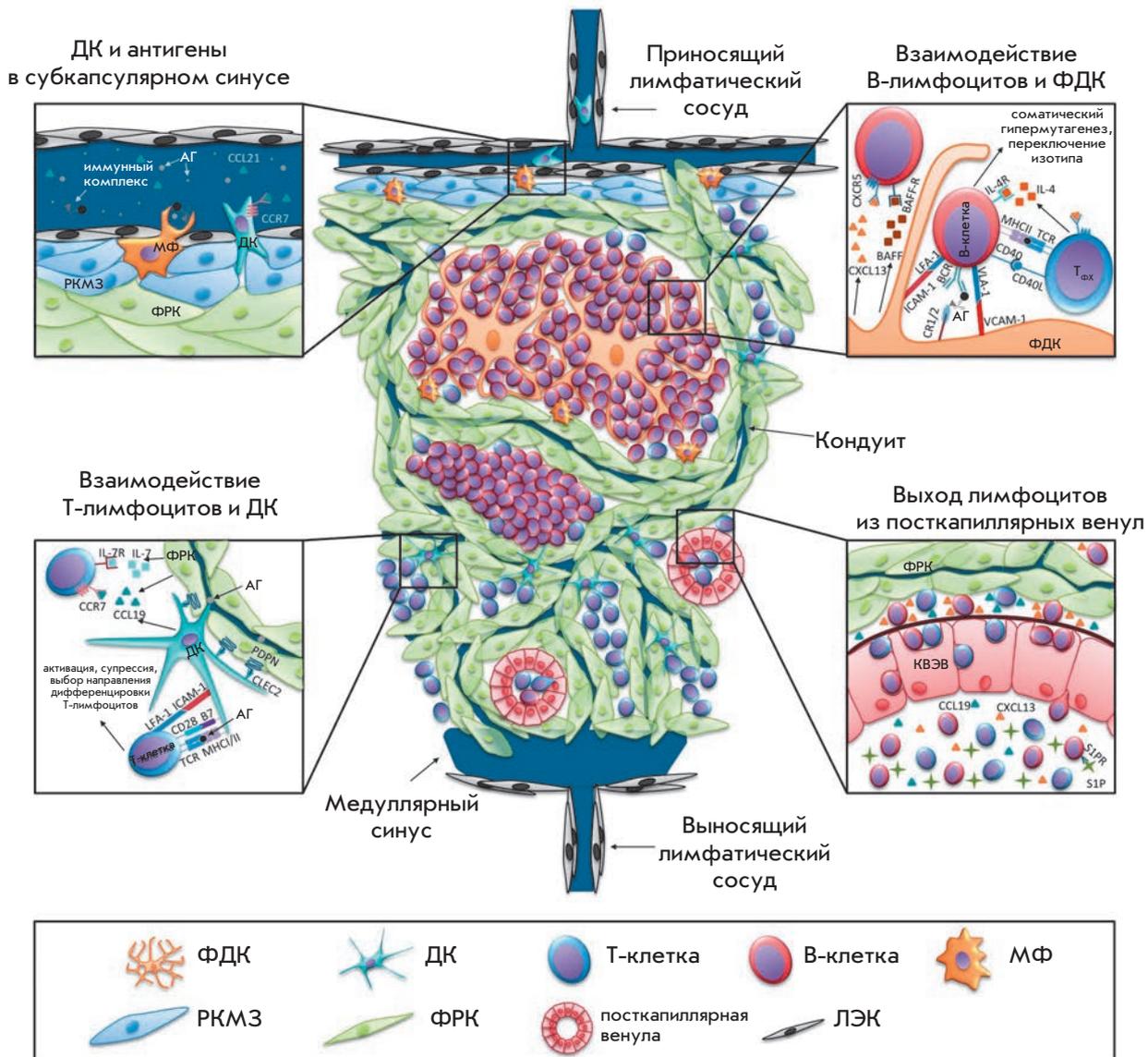


Рис. 1. Схема строения зрелого лимфатического узла. Наиболее важные события, происходящие в лимфоузле, проиллюстрированы с большей детализацией. Лимфа через приносящий лимфатический сосуд поступает в лимфоузел по системе кондуитов, затем собирается в медуллярном синусе и покидает орган через выносящий лимфатический сосуд. С лимфой в лимфоидный орган проникают антигены (свободные или в составе иммунных комплексов) и антигенпрезентирующие дендритные клетки. Другие типы гемопоэтических клеток проникают в орган через посткапиллярные венулы с высоким эндотелием. В дальнейшем клетки под воздействием цитокинов и хемокинов распределяются по Т- и В-зонам лимфатических узлов, где происходят основные события формирования иммунного ответа. Лимфоциты покидают орган через посткапиллярные венулы под влиянием градиента концентрации сфингозин-1-фосфата (СФ). Строма органа играет ключевую роль в формировании необходимых функциональных ниш, продукции цитокинов и хемокинов и, таким образом, способствует развитию иммунного ответа

Попадание этих клеток в лимфоузел очень важно для гомеостаза иммунной системы, так как для зрелых лимфоцитов стромальные клетки лимфоузлов служат основным источником факторов выживания [42]. Время, которое лимфоцит проводит в лимфоид-

ном органе, определяется балансом хемотактических сигналов. Так, после проникновения в паракортекс лимфоузла под действием градиента концентрации «гомеостатических» хемокинов через специальные венулы с высоким эндотелием в лимфоцитах посте-

пенно усиливается экспрессия рецептора сфингозин-1-фосфата (СФ). Концентрация этого фактора очень высока в крови и лимфе, но он практически не продуцируется в лимфоузлах [49]. Под действием градиента концентрации СФ лимфоциты перемещаются в медуллу органа, а затем выходят через эфферентные лимфатические сосуды в лимфоток. При этом взаимодействие рецептора со своим лигандом СФ приводит к интернализации комплекса и прерыванию хемотактического сигнала, в результате чего клетки вновь приобретают возможность проникать в лимфоузлы под действием градиента концентраций хемокинов в крови [50]. Эта система обеспечивает эффективную рециркуляцию лимфоцитов в организме, что необходимо для отбора лимфоцитов с оптимальной специфичностью Т- и В-клеточных рецепторов (TCR и BCR) к появившимся в данный момент антигенам [51].

Помимо привлечения и поддержания гомеостаза иммунных клеток, лимфатические узлы обеспечивают формирование всех необходимых взаимодействий для эффективного иммунного ответа, который обусловлен не только свойствами презентующих и эффекторных клеток, но и особой архитектурой лимфоузла [26]. Так, кортекс органа пронизан системой кондуитов, по которым перемещаются лимфоциты и на которых оптимально расположены антигенпрезентирующие клетки. Такая пространственная организация обеспечивает наибольшую вероятность встречи клеток этих двух типов, что облегчает поиск рецепторов, специфичных к конкретному антигену, представленному на дендритных или других антигенпрезентирующих клетках, среди огромного репертуара Т-клеточных рецепторов [8, 48, 51].

СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

Вклад отдельных типов стромальных клеток в поддержание и функционирование лимфоузла, их взаимодействие и происхождение пока недостаточно понятны. На сегодняшний день самыми изученными мезенхимальными стромальными клетками вторичных лимфоидных органов являются фибробластные ретикулярные клетки (ФРК) и фолликулярные дендритные клетки (ФДК) [33, 40, 43, 50, *рис. 1*]. Первые играют важную роль преимущественно в работе Т-лимфоцитов, тогда как ФДК необходимы для полноценной функции В-зон [25, 42]. ФРК образуют и поддерживают систему кондуитов, необходимую для миграции и взаимодействия иммуноцитов и доставки антигенов из лимфы [48, 52]. Для функционирования лимфоузла важны три основных типа эндотелиальных клеток: лимфатические эндотелиальные клетки (ЛЭК), кровеносные эндотелиальные клетки (КЭК) и их разновидность

– клетки высокого эндотелия венул (КВЭВ) [33, 42]. Роль этих клеток заключается в поддержании постоянного контакта органа с лимфатической и кровеносной системами, точнее, обеспечении обмена иммунными клетками и антигенами. ЛЭК обеспечивают привлечение и проникновение в лимфоузел мигрирующих дендритных клеток, а также перенос антигенов из лимфы в систему кондуитов лимфоузла [53, 54]. Обычные КЭК выстилают кровеносные сосуды, проходящие в органе, тогда как КВЭВ обеспечивают миграцию лимфоцитов из кровотока в паракортекс лимфоузла, откуда те распределяются по соответствующим зонам в органе [42]. Недавно был открыт еще один тип стромальных клеток, располагающихся в субкапсулярной зоне лимфоузлов, а также обнаруживаемых в других вторичных лимфоидных органах, но отсутствующих в третичных – ретикулярные клетки маргинальной зоны (РКМЗ) [55, 56]. Показано, что РКМЗ являются непосредственными предшественниками ФДК, в том числе при формировании зародышевых центров в фолликулах [57]. Также постулируется их роль в поддержании пула ФРК, но это утверждение требует строгого доказательства.

Основная проблема в этой области исследований состоит в том, что, несмотря на достаточно полное описание функций стромальных клеток, их точный фенотип все еще остается предметом дискуссий, и разные авторы придерживаются разных точек зрения [33, 42, 45, 58]. Отчасти это связано с тем, что универсальные поверхностные маркеры обнаружены далеко не на всех стромальных клетках. Многие из изучаемых поверхностных молекул относятся к неизбирательным маркерам многих клеточных популяций. Так, основными маркерами большинства зрелых стромальных клеток лимфоузлов и их предшественников считаются молекулы адгезии ICAM-1 и VCAM-1, которые обеспечивают как межклеточные контакты в стромах, так и взаимодействие с приходящими иммунными клетками, экспрессирующими на своей поверхности соответствующие интегрины [32, 59]. Важным маркером некоторых типов стромальных клеток лимфоузлов, главным образом ЛЭК и ФРК, является гликопротеин подопланин (gp38). Эта молекула играет важную роль в поддержании нормального состояния эндотелиальных клеток сосудов и капсулы в лимфоузле, регулирует снабжение органа кровью и лимфой, миграцию дендритных клеток и адаптивную реакцию ФРК при сильном воспалении [54, 60]. Для всех эндотелиальных клеток характерна экспрессия CD31 как основного маркера эндотелия. Специфические поверхностные маркеры большей части стромальных клеток лимфоузлов не известны, их характе-

ризируют либо по совокупности ряда «пан-маркеров», либо по экспрессии специфических генов и продукции соответствующих факторов, однако это еще не устоявшаяся классификация. Так, еще недавно экспрессия хемокина CXCL13 в зрелом лимфоузле приписывалась исключительно ФДК, предполагаемым основным участникам В-клеточного ответа. На сегодняшний день существуют данные о том, что ретикулярные клетки маргинальных зон (РКМЗ) и даже ФРК также способны синтезировать CXCL13, а нарушение его продукции этими клетками оказывает существенное влияние на функцию В-лимфоцитов и иммунный ответ [42, 44]. Тем не менее часть стромальных клеток можно выделить по совокупности экспрессии нескольких поверхностных маркеров. Так, ФДК экспрессируют CD35, CD21 (рецепторы комплемента), FcγRIIB, улавливающие иммунные комплексы для последующей презентации В-лимфоцитам в герминативных центрах, и не несут при этом на поверхности типичных маркеров гемопоэтического ряда (например, CD45) [45]. РКМЗ и, возможно, ФДК экспрессируют молекулы адгезии MAdCAM-1 [55]. ФРК часто выделяют по признаку продукции компонентов межклеточного матрикса, необходимых для сборки кондуитов, например, ERT7 [58], однако такие маркеры можно использовать только при иммуногистохимическом окрашивании срезов лимфоузлов, но не при цитометрии, когда клетки не связаны с компонентами матрикса. Для ЛЭК характерна экспрессия маркера Luve-1, а КВЭВ в зрелом лимфоузле, в отличие от КЭК, специфически экспрессируют адрессин PNA_d и молекулы адгезии MAdCAM-1 [42].

Таким образом, стромальный компартмент лимфатических узлов и других вторичных лимфоидных органов находится в стадии активного изучения, и остается много вопросов, которые требуется прояснить для полноценного понимания функций всех клеток-участников. Такое понимание важно для биоинженерии искусственных лимфоидных органов, целью которой является создание функционального органа из минимального числа хорошо охарактеризованных компонентов. На основе данных о функционировании лимфоидных органов можно предположить, что для эффективного выполнения своей функции искусственный лимфоузел должен иметь соответствующую инфраструктуру, представленную, в первую очередь, правильно организованным стромальным компартментом. Внесение всех нужных компонентов стромы будет определять эффективность той или иной иммунной реакции, происходящей в данной системе, а также позволит отслеживать стадию развития искусственного органа на основании анализа состава стромальных клеток.

ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

Для успешной биоинженерии искусственных лимфоузлов важно понимать процессы, определяющие развитие лимфоидных органов в эмбриогенезе. Такое знание может позволить дифференцировать все необходимые типы клеток из клеток-предшественников, выделенных из эмбриональной ткани, либо получать из клеток-предшественников цельный орган. Краткая схема развития лимфоидного органа на примере лимфоузла представлена на *рис. 2*. Установлено, что в процессе эмбриогенеза зачаток лимфоузла (анлаген) закладывается в определенных местах в результате дифференцировки эндотелия венул в лимфатический эндотелий [61] и формирования эндотелиального кармана, который в дальнейшем участвует в образовании капсулы и сети кондуитов в лимфоузле, а также связывает орган с лимфатической и кровеносной системами [32]. Дальнейшие события затрагивают малодифференцированные мезенхимальные клетки вокруг сосудов (перичиты), являющиеся предшественниками ФДК и, по-видимому, всех других стромальных клеток, кроме эндотелиальных [45]. Недавно это было показано для развития селезенки, где из клеток-предшественников, экспрессирующих важные для эмбриогенеза селезенки и поджелудочной железы транскрипционные факторы Nkx2-5 и Islet-1, образуются ФДК, ФРК и другие стромальные клетки [62], хотя происхождение всех типов стромальных клеток из одной популяции клеток-предшественников в случае лимфоузлов еще требует строгого доказательства. Эндотелиальные карманы дают начало лимфатической системе организма, а также лимфоузлам. Выбор местоположения лимфатического узла определяется локальной секрецией ретиноевой кислоты (РК) окончаниями нервных волокон [63]. Под воздействием РК мезенхимальные предшественники начинают секретировать хемокин CXCL13, привлекающий клетки-индукторы лимфоидной ткани (lymphoid tissue inducer cells – LTiC), на поверхности которых появляются молекулы адгезии ICAM-1 и VCAM-1. С этого момента мезенхимальные предшественники называют клетками-организаторами лимфоидной ткани (lymphoid tissue organizer cells – LToC). LTiC мигрируют к анлагену лимфоузла, главным образом, под действием градиента концентрации хемокина CXCL13 и взаимодействуют с LToC [63]. Установлено, что на этом этапе крайне важна передача сигнала через LTβR, который находится на поверхности LToC [64]. Основным лигандом LTβR, участвующим в эмбриогенезе лимфоузлов, – гетеротример LTα₁β₂, который появляется на поверхности LTiC после их взаимодействия с рас-

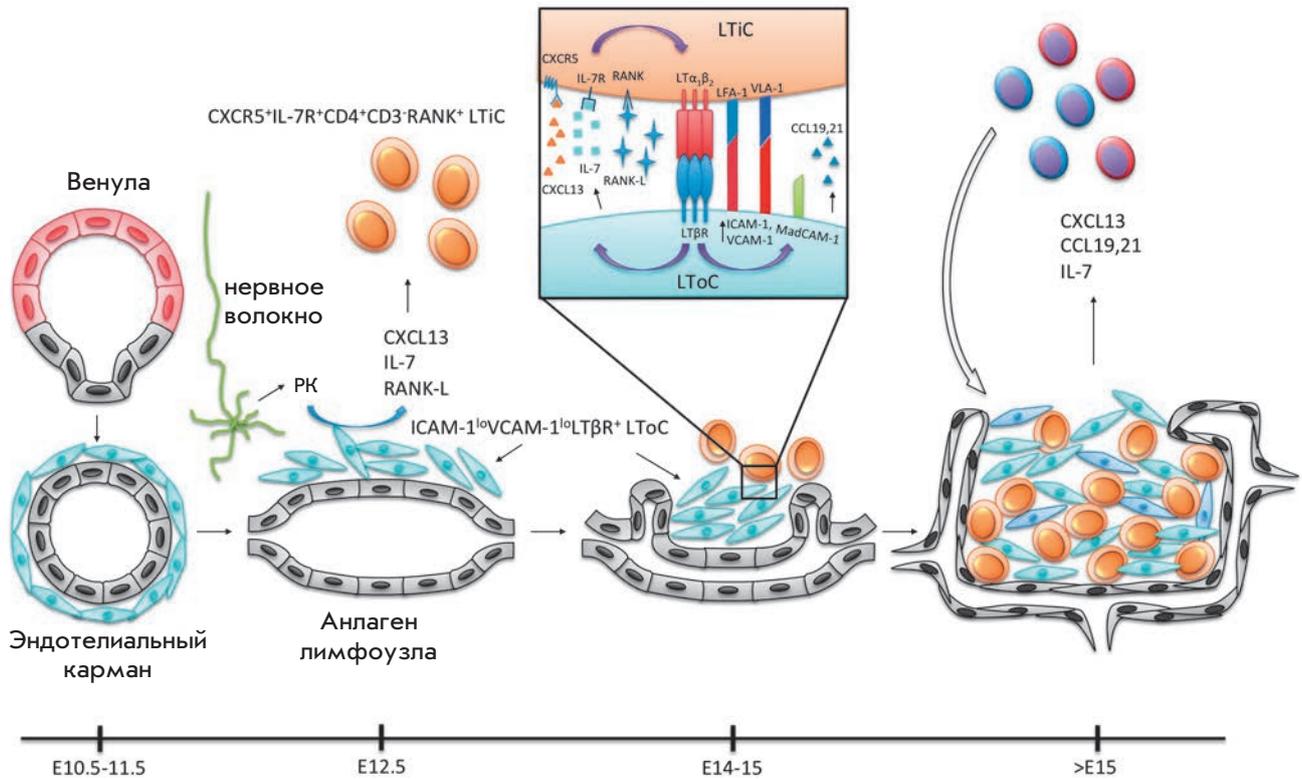


Рис. 2. Схема начальных этапов развития лимфатических узлов. Сроки этапов указаны для организма мыши (варьируются для различных лимфатических узлов). Первоначально происходит закладка лимфатических эндотелиальных карманов, возникающих из эндотелия венул. Эти карманы дают начало лимфатической системе организма, в том числе периферическим лимфатическим узлам. Место закладки лимфоузлов определяется экспрессией нервными окончаниями ретиноевой кислоты (РК). Под влиянием РК происходит активация экспрессии хемокина CXCL13 и других цитокинов мезенхимальными предшественниками вокруг эндотелиального кармана. Под воздействием градиента концентрации хемокина в очаг образования лимфоузла мигрируют LTiC. Важнейший этап формирования органа – взаимодействие LTiC со стромальными предшественниками, которые теперь называются LToc, через взаимодействие LTαβ на поверхности LTiC и LTβR на поверхности LToc. Этот сигнальный путь является ключевым для развития большинства вторичных лимфоидных органов, включая лимфоузлы. Он приводит к дальнейшей дифференцировке LToc, которые, предположительно, дают начало всем мезенхимальным стромальным клеткам лимфоузлов. Под воздействием большого количества хемокинов и цитокинов, а также благодаря экспрессии молекул адгезии MAdCAM-1 и PNA_d происходит миграция лимфоцитов в зачаток лимфоузла. Лимфоциты способствуют дальнейшей дифференцировке стромальных клеток и формированию архитектуры органа посредством членов суперсемейства TNF, таких, как сам TNF, LT, LIGHT и др.

творимым фактором TRANCE (RANK-L), точный источник которого пока не известен, но предполагается, что им могут быть сами LTiC [59, 65, 66]. У мышей с дефицитом LTβR или LTα полностью отсутствуют вторичные лимфоидные органы (кроме лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой носовой полости [67]), а у мышей с генетической инактивацией LTβ развиваются только шейные и брыжеечные лимфоузлы, что указывает на исключительную важность этого сигнального пути в эмбриональном развитии [34, 59]. Этот сигнальный путь запускает дальнейшую дифференцировку LToc, что приво-

дит к усилению экспрессии молекул адгезии, появлению на поверхности клеток MAdCAM-1 и PNA_d, а также к увеличению экспрессии хемокинов, привлекающих все новые гемопоэтические клетки в очаг формирования будущего лимфоузла [32, 59, 64]. Еще один важный для развития лимфоидных органов молекулярный каскад – передача сигнала через рецептор TNFR1. Показано, что генетическая инактивация как TNF, так и TNFR1 приводит к нарушению развития ФДК у мышей и, как следствие, к отсутствию зародышевых центров в лимфоидных органах [68]. Стоит отметить, что члены суперсемейства TNF

играют важную роль в образовании и поддержании не только лимфоузлов, но и всех других лимфоидных органов [34, 59, 65, 68–71]. Таким образом, наблюдается синергия различных сигнальных путей, приводящая в итоге к полноценному формированию и функционированию иммунной системы.

На следующем этапе развития органа, по-видимому, происходит накопление гемопоэтических клеток в формирующемся лимфоузле, что приводит к его разрастанию, дальнейшей дифференцировке стромальных клеток, образованию венул с высоким эндотелием, зачаточных фолликулов и других компартментов, характерных для лимфоузлов [32, 59, 72]. На начальных этапах формирование структурных отделов лимфоузлов происходит независимо от Т- и В-лимфоцитов, тогда как на поздних стадиях они активно проникают в органы и участвуют в окончательном созревании лимфоидных фолликулов и дальнейшем поддержании инфраструктуры стромы за счет передачи сигнала через $LT\beta R$ и $TNFR$ [26, 36]. В данном случае важную роль играет не только $LT\alpha_1\beta_2$, но и еще один лиганд для $LT\beta R$ – LIGHT [65]. Таким образом, формирование и функционирование полноценного лимфоузла (как и других вторичных лимфоидных органов) сильно зависит от взаимодействия мезенхимальных и гемопоэтических клеток, что необходимо учитывать при биоинженерии этих органов. Оба клеточных компонента (в виде зрелых клеток или, возможно, клеток-предшественников) должны быть правильно организованы в зоне закладки и формирования лимфоузла для его эффективного развития и дальнейшего функционирования.

БИОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ

Помимо минимального набора типов клеток, необходимых для функционирования искусственного лимфоузла, важно также сформировать некий каркас, который будет служить структурной основой для правильного расположения клеток в пространстве, что требуется для их эффективного взаимодействия. В ходе онтогенеза стромальные клетки сами выстраивают необходимую структуру, состоящую из полимерных, преимущественно коллагеновых, волокон [58, 59]. В случае биоинженерии искусственного лимфоузла необходимо изначально иметь трехмерный остов, на основе которого клетки будут формировать трехмерную клеточную культуру, а затем и полноценный орган. Это крайне важно на начальных этапах, когда клетки еще не создали свой собственный полимерный каркас, необходимый для их дальнейшей дифференцировки и обеспечения их выживания и функциональности.

Наиболее перспективными для биоинженерии лимфоидных органов представляются искусственные каркасы на основе биоматериалов. Такие материалы состоят в основном из модифицированных полимеров природного происхождения как полисахаридного, так и белкового: фиброина (основного компонента шелка кокона тутового шелкопряда *Bombyx mori*) (рис. 3) [35, 36], спидроина (основного компонента паутины) [73–75], альгината (смесь полисахаридов клеточной стенки водорослей) [76], коллагена [77] и др. Используют также синтетические полимеры, например, PLG (полилактат-ко-гликолат), PLA (полилактат), PGA (полигликолат) и др. [78]. Для улучшения таких свойств полимеров, как упругость, иммуногенность, адгезивность, устойчивость к внешним воздействиям, применяют различные модификации субстрата, например гидроксиапатитом или коллагеном (желатином) [79].

Обязательное требование к биоинженерным материалам – отсутствие антигенных, канцерогенных, токсических и других свойств, ограничивающих их применение в медицине. Подобные эффекты, как правило, связаны с присутствием в полимерном субстрате активных групп, образованных мономером.

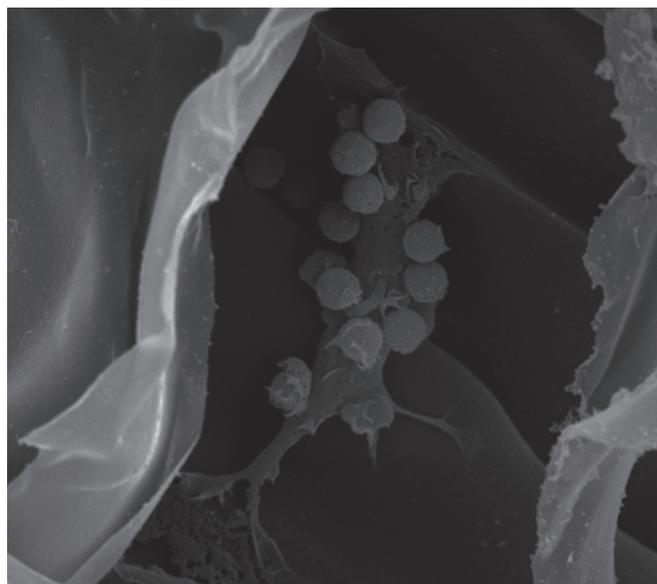


Рис. 3. Пример использования фиброиновых полимерных матриц для биоинженерии искусственных лимфоидных органов. Представлена электронная микрофотография совместной культуры дендритных клеток костномозгового происхождения и спленоцитов в матриксе. В середине находится дендритная клетка, взаимодействующая с группой лимфоцитов. По краям видны структуры фиброинового матрикса

рами или инициаторами реакции полимеризации. Поэтому необходимо тщательно контролировать состав материала, его очистку и модификации для последующего применения [80]. Нежелательные эффекты *in vivo* являются основной причиной того, что многие созданные биоматериалы пока не нашли широкого клинического применения. В связи с этим проводится работа по улучшению свойств биоинженерных материалов, и уже отобраны несколько видов структур, биосовместимых в экспериментах на животных [11, 75]. Впрочем, полностью избежать иммунной реакции организма не удастся, так как почти всегда используются чужеродные материалы. Главная цель при разработке этих материалов состояла в том, чтобы избежать системного ответа и сильного воспаления.

Все обсуждаемые биоматериалы, как правило, представляют собой трехмерный каркас с сетчатой структурой, максимально приближенной к структуре волокон внеклеточного матрикса в животных тканях. По аналогии с ними такие биоинженерные структуры тоже называют матриксами, подчеркивая тем самым их применение в качестве каркаса – трехмерного остова для роста заселенных в них клеточных популяций. Этот подход нашел применение, в первую очередь, в получении 3D клеточных культур, так как известно, что многие особенности взаимодействия клеток в функционирующем органе нельзя воспроизвести в неестественной для клеток среде на поверхности культурального пластика [81]. Матрикс может представлять собой гелеподобную сеть полимеров, например, коллагеновый матрикс, а может иметь более твердую оформленную структуру, которая сохраняет свою форму при проведении механических манипуляций, например при имплантации в организм животного. Последнее обстоятельство наиболее важно для возможного применения материала в медицине, изучения поведения клеток непосредственно в живых объектах, а также в биоинженерии искусственных органов. Для формирования соответствующей формы и текстуры матрикса используется множество подходов [78]. Необходимо, чтобы при полимеризации того или иного мономера, из которого будет сформирован матрикс, образовалась соответствующая трехмерная пористая структура, в противном случае объем каркаса не будет доступным для заселения клетками или насыщения каким-либо веществом.

В некоторых работах для улучшения биосовместимости каркасов используют подход с применением естественного внеклеточного матрикса из организма животных, предварительно освобожденного от населяющих его клеток [82]. Полученные таким образом материалы не вызывают иммунного ответа при их

имплантации, так как не являются чужеродными для организма, однако, как правило, они более подвержены деградации ферментами, что может быть как достоинством, так и недостатком, в зависимости от поставленной задачи.

Однако каркас для искусственного органа – не единственное применение подобных систем. Все больший интерес вызывает использование матриц для связывания различного рода растворимых биологических факторов с их последующей постепенной диффузией из толщи матрикса, что сможет обеспечить постепенный и протяженный во времени выход биологически активных веществ. В контексте биоинженерии искусственных лимфоузлов эта область интересна тем, что позволяет создать искусственный градиент хемокинов и ростовых факторов, что может быть необходимым для начального запуска программы по поддержанию развития органа. Как уже обсуждалось, в эмбриогенезе привлечение клеток к месту закладки лимфоузла и последующая их дифференцировка достигаются за счет экспрессии предшественниками стромальных клеток, главным образом, хемокина – CXCL13. В случае конструирования искусственного органа источником этого хемокина могли бы стать специальные полимерные частицы, разработкой которых сейчас занимается несколько групп ученых. Так, сообщается [83] о создании альгинатных микросфер, которые можно насытить каким-либо хемокином с его последующим постепенным высвобождением в среду. Такие микросферы имеют размер 5–20 мкм, что позволяет проводить с ними различные манипуляции, например, использовать как источник веществ, привлекающих клетки при моделировании органов и тканей *in vitro*. Другой подход к созданию материалов, обеспечивающих контролируемый выход факторов, обусловлен использованием биоразлагаемых полимеров, ковалентно сшитых с каким-либо активным веществом. При действии ферментов или спонтанном гидролизе будут постепенно высвобождаться и связанные с матриксом факторы, с последующим выполнением своей биологической функции [84].

ДОСТИЖЕНИЯ В БИОИНЖЕНЕРИИ ИСКУССТВЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ

Как мы уже отмечали, задача биоинженерии искусственных органов важна, в первую очередь, из-за своего возможного клинического применения. Крайне заманчивой представляется возможность использования таких органов для репрограммирования иммунного ответа при целом ряде заболеваний. При этом для каждой конкретной задачи итоговая система может иметь не все характеристики нормальных органов, а только те, которые необходимы

для выполнения данной функции. Если искусственные лимфатические узлы смогут обеспечить привлечение, выживание, взаимодействие, активацию и функцию иммунных клеток, то это позволит направлять формирование иммунного ответа в определенном, наиболее эффективном направлении. Искусственные лимфоузлы можно заселять *in vitro* активированными и насыщенными определенными антигенами ДК. После имплантации полученных систем дендритные клетки будут эффективно взаимодействовать с приходящими лимфоцитами, направляя их дифференцировку и функциональную активность. Преимущество таких систем перед вакцинацией антигеном или введением в организм суспензии активированных ДК состоит в том, что они будут представлять подавляющее большинство антигенпрезентирующих клеток в искусственном лимфоузле, а значит, с высокой вероятностью каждый пришедший лимфоцит, специфический к данному антигену, будет подвержен влиянию определенных цитокинов и костимуляторных молекул на поверхности ДК. Предполагается, что имплантация таких систем непосредственно в очаг опухолевого роста или аутоиммунной реакции позволит репрограммировать специфические лимфоциты и оказывать терапевтическое воздействие. Хотя до реализации этой идеи требуется пройти длительный путь создания полноценного функционального искусственного лимфоузла, уже возможно создание редуцированных систем, которые также могут иметь определенное клиническое значение. Основные опубликованные достижения в этой области суммированы в *таблице*.

Так, показана возможность применения матрикса для вакцинации против меланомы у мышей [11, 85]. С этой целью PLG-матрикс насытили гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ), синтетическим олигонуклеотидом, содержащим метилированный CpG, а также частично лизированными клетками меланомы, терапевтическое действие против которой изучали. Предварительно установили, что ГМ-КСФ необходим для привлечения и активации дендритных клеток мыши. CpG добавляли для стимуляции дифференцировки ДК в направлении, приводящем к активации Т-хелперов первого типа, что считается наиболее адекватным ответом на опухоль [86]. Показано, что имплантация таких «структурных вакцин» в виде трехмерного матрикса приводит к рекрутированию кожных ДК мыши, их активации и последующей миграции в дренирующий лимфатический узел. Там они участвуют в созревании специфических Т-хелперов первого типа, что, в конечном итоге, приводит к усилению противоопухолевого ответа у мышей, который проявляется снижением смерт-

ности в модели перевиваемой опухоли. В этой работе матрикс, насыщенный факторами дифференцировки, привлечения дендритных клеток и опухолевыми антигенами, частично выполнял функции третичного лимфоидного органа. Это – простейшая модель, в которой, тем не менее, наблюдали функциональную связь имплантированной структуры с лимфатической системой мыши, что приводило к специфическому направленному иммунному ответу. Показано, что опухоли отторгались в результате индукции сильного цитотоксического ответа лимфоцитов CD8⁺. Важно, что эта схема терапии уже адаптирована для человека и в настоящее время находится на первой стадии клинических испытаний (<https://clinicaltrials.gov/show/NCT01753089>).

В другой модели, более близкой к настоящему иммунному органу [10], пытались создать прототип человеческого лимфатического узла *in vitro*. С этой целью разработали биореактор, имитирующий положение органа относительно сосудистой системы организма. Он содержал в себе первую ячейку, в которой находился матрикс с дендритными клетками, соответствующий лимфатическому узлу, и вторую ячейку, в которую помещали суспензионные лимфоциты как модель кровотока. Ячейки сообщались между собой через пористую мембрану, что обеспечивало свободную циркуляцию как растворимых факторов, так и клеток. Показано, что такая система, при условии регулярной смены среды, достаточно стабильна и может существовать на протяжении минимум 2 недель с сохранением активности клеток. Через 2 недели культивирования оказалось, что, помимо дендритных клеток, в матриксе присутствуют популяции Т- и В-лимфоцитов, пришедших из смежной ячейки биореактора. Лимфоциты, как и дендритные клетки, формировали внутри матрикса кластеры, что могло свидетельствовать об их возможной функциональной активности. Эту модель представляют в качестве возможной тест-системы для изучения действия некоторых лекарственных средств, а также клеточных взаимодействий *in vitro*. Эта модель достаточно хорошо отображает часть происходящих в лимфоузле процессов, а именно, миграцию лимфоцитов и их взаимодействие с дендритными клетками.

Однако, несмотря на успехи, достигнутые в биоинженерии редуцированных моделей лимфоузлов, стало ясно, что полноценный орган не может существовать и функционировать без специальной образующей его стромы. Это привело к активному изучению как биологии стромальных клеток, так и к попыткам использования их для моделирования лимфоидной ткани. Эти два направления были объединены в одной работе [87]. Известно, что при достаточно сильном локальном воспалении увеличи-

ваются размеры и клеточность дренирующих лимфоузлов. Эта адаптивная реакция обеспечивается увеличением скорости деления ФРК проксимального к очагу воспаления лимфоузла, а также увеличением уровня экспрессии хемокинов CCL21 и CCL19, что приводит к привлечению к этому лимфоузлу большего количества лимфоцитов и дендритных клеток. Так как одним из первых изменений при локальном воспалении является значительное увеличение скорости тока лимфы в дренирующий лимфоузел [88], была выдвинута гипотеза, согласно которой ФРК могут реагировать на скорость движения лимфы по системе кондуитов, что приводит к ряду функциональных изменений, например, усилению экспрессии этими клетками хемокинов. Для проверки этой гипотезы авторы сконструировали *in vitro* модель лимфоузла, состоящую из матрикса, заселенного стабильной линией фибробластных ретикулярных клеток, через который проходил регулируемый поток лимфатической жидкости. Показано, что в условиях потока жидкости секреция CCL21 и CCL19 клетками больше, чем в статичной системе. Более того, ток лимфы влиял не только на экспрессию хе-

мокинов, но и на скорость деления клеток, а также на их пространственную организацию в матриксе.

Интересно, что в случае тока жидкости часть клеток формировала специфические каналоподобные структуры, ориентированные по направлению тока. Подобная организация не наблюдалась в статичных условиях. Также под влиянием потока лимфы клетки реорганизовывали матрикс, в котором находились, создавая в нем пространственно-ориентированные структуры. Предполагается, что, помимо участия в реакции лимфоузла на воспаление, ток лимфы может играть роль и при организации структуры органа, регулируя положение и функцию стромальных клеток.

Это очень интересное наблюдение, сделанное на простом прототипе лимфоузла, состоящем из всего одного типа стромальных клеток, наглядно показывало сложную системную взаимосвязь всех компонентов, которую можно изучить исключительно на модели искусственного лимфоидного органа.

Наибольшего успеха в биоинженерии искусственного лимфоузла добились японские ученые, разработавшие систему на основе коллагеново-

Опубликованные модели искусственных лимфоидных органов

Тип объекта	Полимерный каркас	Клеточный состав	Функциональная активность	Ссылка
Биоинженерная вакцина против меланомы	PLG-матрикс, насыщенный ГМ-КСФ, CpG и лизатом опухолевых клеток	Миелоидные дендритные клетки	Привлечение дендритных клеток, в результате чего происходило их созревание, дальнейшая миграция в дренирующий лимфатический узел и активация противоопухолевого иммунного ответа	[11, 49, 51]
<i>In vitro</i> модель человеческого лимфатического узла – био-реактор	Полисульфониевый биореактор с полипропиленовыми волокнами в качестве сосудов и агарозными матриксами, на которых росли клетки	Миелоидные дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты	После запуска системы происходила секреция цитокинов, специфических антител и формирование иммунной памяти в ответ на антигенный стимул	[10, 52]
ФРК-компаратмент лимфатического узла мыши	Полиуретановый матрикс, модифицированный коллагеном	Фибробластные ретикулярные клетки (ФРК)	В ответ на изменения скорости тока жидкости через матрикс происходила адаптивная реакция ФРК, выраженная в повышенной экспрессии хемокинов CCL21 и CCL19 и повышенной скорости деления этих клеток	[50]
Искусственный лимфатический узел мыши	Коллагеновый матрикс	Линия тимусных эпителиальных клеток, продуцирующих LT α , и миелоидные дендритные клетки	После имплантации матриксов с клетками под капсулу почки происходила миграция в него лимфоцитов, формирование Т- и В-зон, продукция антиген-специфических антител. После переноса искусственных лимфоузлов у мышей с иммунодефицитом восстанавливалась продукция антител	[53, 54]
Искусственный тимус мыши	Полимерный каркас не использовали	Агрегат эмбриональных тимоцитов, мезенхимальных клеток и Foxp1 ⁺ фибробластов	При имплантации в бестимусных мышей агрегаты полностью обеспечивали функцию тимуса, генерировали наивные Т-лимфоциты всех основных субтипов	[55]

го матрикса [89, 90]. Они заселяли такие матриксы эпителиальными клетками тимуса линии TEL-2 [91], предварительно трансфицированными вектором, содержащим ген лимфотоксина α (LT α), а также ДК, полученными из культуры костного мозга. Такие структуры подсаживали под капсулу почки мышам и наблюдали миграцию в матрикс лимфоцитов реципиента, пространственную кластерную организацию Т- и В-клеток в матриксе, похожую на организацию в лимфатическом узле. При этом показали, что предварительное заселение матрикса дендритными клетками необходимо для эффективной миграции в него клеток реципиента. Кроме того, в матриксе обнаружены клетки, экспрессирующие маркеры эндотелия, что свидетельствовало о росте сосудов. Матрикс, который в течение некоторого времени находился в организме мыши, извлекали и переносили в мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). После трансплантации у мышей с иммунодефицитом наблюдали миграцию клеток из матрикса в селезенку и секрецию антител класса IgG. Показано, что если матриксы с клетками сначала имплантировать мышам, предварительно иммунизированным белковым антигеном (использовали модифицированный овальбумин NP-OVA), а уже затем мышам с иммунодефицитом, то антитела, обнаруживаемые у мышей с иммунодефицитом после трансплантации такого матрикса, имели специфичность к этому антигену. Совокупность полученных данных дала основание назвать полученную систему искусственным лимфатическим узлом. Следует отметить, что в этой работе использовали коллагеновые матриксы, хотя они достаточно быстро деградировали и уменьшались в размерах, что могло сказаться на их эффективности в длительных экспериментах. Для обеспечения длительного нахождения и функционирования искусственного лимфоидного органа в организме реципиента желательнее использовать в качестве биоинженерного каркаса более инертные материалы.

Не менее важной задачей является создание искусственного тимуса, что может иметь большое значение для медицины, поскольку с возрастом происходит инволюция тимуса и, как следствие, снижение количества новых Т-лимфоцитов в организме человека, что способствует снижению иммунного ответа на новые инфекции. Создание искусственного тимуса могло бы помочь решить эту проблему. Недавно была опубликована многообещающая работа [92], в которой разработана система получения тимусных эпителиальных клеток (ТЭК), необходимых для функционирования тимуса, с помощью *in vitro* репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) под действием важного для ТЭК транс-

крипционного фактора Foxn1. Показано, что в ходе дифференцировки трансформированные клетки приобретают фенотип нормальных ТЭК: экспрессируют поверхностные маркеры (EpcAM) и гены факторов, важных для их функциональной активности (Dll4, CCL25, Kitl и др.). При этом, несмотря на участие фактора Foxn1 в развитии эпителиальных клеток кожи, в трансформированных МЭФ не обнаружено экспрессии специфических для них генов, что свидетельствует об их ориентации в направлении эпителия тимуса, а не кожи. Далее полученные клетки были охарактеризованы по способности обеспечивать созревание предшественников Т-лимфоцитов *in vitro*, подобно тому, как это происходит в нормальном тимусе. Показано, что сокультивирование трансформированных МЭФ и предшественников Т-лимфоцитов приводит к образованию транзитных популяций тимоцитов (CD4⁺CD8⁺), а также терминально дифференцированных CD4⁺ и CD8⁺ наивных Т-клеток в количествах, сопоставимых с получаемыми при использовании в качестве стромы ТЭК, выделенных из эмбрионального тимуса мыши. При этом нетрансформированные МЭФ не обеспечивали созревания тимоцитов. Немаловажно, что полученные клетки экспрессировали молекулы МНС класса II на уровне, сравнимом с нормальными ТЭК. При этом молекулы МНС класса II экспрессировались только после добавления предшественников Т-лимфоцитов в культуру, что еще раз подчеркивает важность взаимосвязи стромальных и гемопоэтических клеток в функционировании лимфоидных тканей. Известно, что молекулы МНС класса II на поверхности ТЭК важны для селекции тимоцитов в тимусе по способности распознавать молекулы главного комплекса гистосовместимости и при этом незначительно связывать аутоантигены, чтобы на выходе получить функциональные ауто-толерантные клетки. Примечательно, что для последней функции важен ген *AIRE* ТЭК, который экспрессируется, как показано, и в трансформированных *Foxn1* фибробластах. Наконец, полученные клетки использовали в качестве основы модели искусственного тимуса. С этой целью получили тканевые агрегаты, состоящие из трех типов клеток: предшественников Т-лимфоцитов, мезенхимальной стромы эмбрионального тимуса в качестве источника факторов выживания и трансформированных МЭФ. После получения такие агрегаты имплантировали мышам под капсулу почки и через 3–4 недели наблюдали формирование тимусной ткани. Изучение состава этой ткани показало, что агрегаты, полученные с использованием трансформированных фибробластов, после имплантации структурно и функционально воспроизводили ткань нормального тимуса.

Эти органоиды были сопоставимы с искусственной тканью, полученной при имплантации агрегатов с эмбриональными ТЭК, тогда как клеточные агрегаты с добавлением нетрансформированных МЭФ оказались неспособными к формированию тимусной ткани. Полученную систему с уверенностью можно назвать прототипом искусственного тимуса. В нем обнаружено формирование двух подтипов ТЭК, необходимых для полноценной селекции тимоцитов, и их пространственное разделение на зоны, подобно нормальному тимусу. Профили экспрессии генов и поверхностных маркеров, характерных для ТЭК, были сопоставимыми с профилями в нормальном эмбриональном тимусе. Искусственный тимус оказался способным поддерживать дифференцировку Т-лимфоцитов в направлении как $TCR\alpha\beta CD4^+/CD8^+$, так и $TCR\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Наконец, при имплантации полученных систем бестимусным (Nude) мышам в их периферической крови и селезенке формировались зрелые наивные Т-лимфоциты, что доказывало полноценную функциональность органа. Эта работа является важным этапом на пути к биоинженерии искусственного тимуса, в том числе с целью клинического применения [92]. Открытым остается вопрос получения мезенхимального компартмента, так как в указанной работе он был образован эмбриональной тимусной тканью, что невозможно в случае создания искусственного органа для взрослого организма. Решение этой проблемы позволит создать полностью биоинженерный функционально активный орган, который может помочь лучше понять природу происходящих в тимусе процессов селекции тимоцитов и стать важным инструментом при лечении иммунодефицитов человека.

Следует подчеркнуть, что подходы, использующие трансформированные линии клеток, удобны для экспериментальной науки, однако не имеют потенциального клинического применения. Более того, даже в лабораторных исследованиях такие модели будут ограничены одной линией животных, из которых получена культура. Рассматриваются два возможных подхода к решению этой проблемы: использование бесклеточных систем или первичных культур клеток. Первая идея подразумевает внесение в матрикс, служащий основой формирующегося искусственного органа, определенной смеси факторов, которые привлекают и обеспечивают выживание и дифференцировку лимфоидных и стромальных клеток-предшественников как в случае развития нормального лимфоузла. Для создания градиента этих факторов можно использовать дополнительные биоматериалы, обеспечивающие постепенное высвобождение веществ, например альгинатные микросферы. В качестве кандидатных факторов можно применять

хемокины CCL19, CXCL13, цитокины BAFF, IL-7, VEGF, PDGF и др. Задавая индивидуальную динамику высвобождения каждого фактора, можно добиться привлечения и дифференцировки клеток-предшественников из кровотока, не заселяя предварительно матрикс какими-либо клетками. Недавно опубликовали модельную работу, в которой в матрикс заключали два цитокина – VEGF и PDGF [93]. Показано, что определенным образом подобранная динамика высвобождения каждого фактора позволяет эффективно стимулировать ангиогенез в месте имплантации матрикса, что необходимо для миграции в него клеток и питательных веществ. Для создания искусственных органов с использованием этого подхода, разумеется, потребуется комбинация большего числа факторов.

Если бесклеточной системы будет недостаточно для биоинженерии клинически полноценных искусственных лимфоидных органов, то потребуется разработать протокол с использованием клеток. В этом случае наиболее перспективным представляется подход с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (iPSC), на которые возлагаются большие надежды в области персонализированной медицины [94]. На сегодняшний день опубликовано несколько работ, в которых iPSC успешно применили для создания моделей человеческих органов, например тонкого кишечника [95, 96]. В контексте искусственных лимфоидных органов iPSC могут служить источником стромального компартмента, обеспечивающего функциональную активность органа. Эту возможность недавно рассмотрели в обзоре, посвященном биоинженерии искусственного тимуса [97]. В дальнейшем этот перспективный подход смогут использовать и для других лимфоидных органов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя на сегодняшний день уже разработано несколько моделей искусственных лимфоидных органов, критический анализ выявил несколько проблем, которые еще ждут своего решения. Использование трансформированных клеток имеет очевидные ограничения для клинического применения. Биоинженерия органов с использованием первичных культур клеток пока также имеет ограниченное применение. Это связано с тем, что для многих типов клеток, особенно стромальных, в должной мере не разработаны экспериментальные протоколы выделения, культивирования и поддержания в дифференцированном состоянии. Основной интерес для клинического применения представляет возможность получения всех или большинства клеточных типов либо из предшественников, либо путем

трансдифференцировки зрелых клеток, например, через этап получения iPSC. Некоторые типы клеток легко получить в первичной культуре, в том числе и клеток человека, что уже является основой некоторых видов терапии, например адоптивный перенос дендритных клеток или лимфоцитов. Возникает естественная идея объединить два подхода, поместив в каркас искусственного лимфоузла часть клеток в виде первичных культур, а недостаток других заменить добавлением факторов, ожидая, что подобной комбинации будет достаточно для запуска процесса формирования органа, тогда как все необходимые клетки появятся там уже позднее из привлеченных предшественников. Во всех этих направлениях сейчас ведутся активные работы.

Подводя итог, можно сказать, что создание искусственных лимфоидных органов является важной задачей современной иммунологии и биомедицины как с теоретической, так и с практической точек зрения. Успех в этой области обеспечен не только достижениями биоинженерии, но связан и с недавним прогрессом в понимании процессов формирования лимфоидных органов и их функционирования. Безусловно, эта тематика находится на стыке не-

скольких наук: биоинженерии, иммунологии, системной биологии и регенеративной медицины, а потому требует комплексного подхода к изучению, объединения различных подходов, чтобы учесть все или большинство факторов, ответственных за работу таких сложных систем, как лимфоидные органы. ●

Авторы благодарят А.А. Круглова за ценные обсуждения и полезные комментарии.

Электронно-микроскопические изображения матриц получены А.Ю. Архиповой при поддержке ЦКП Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Работа по изучению взаимодействий клеток иммунной системы и цитокинов как регуляторов этого процесса осуществлена при поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», работа по созданию и изучению многокомпонентных трехмерных клеточных систем осуществлена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-01799).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hussain A., Takahashi K., Sonobe J., Tabata Y., Bessho K. // J. Maxillofac. Oral Surg. 2014. V. 13. № 1. P. 29–35.
- Rose F.R.A.J., Oreffo R.O.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 292. № 1. P. 1–7.
- Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. // Biomaterials. 2006. V. 27. № 18. P. 3413–3431.
- Lutolf M.P., Hubbell J.A. // Nat. Biotechnol. 2005. V. 23. № 1. P. 47–55.
- Nayak S., Dey S., Kundu S.C. // PLoS One. 2013. V. 8. № 9. P. 1–17.
- Sun B.K., Siprashvili Z., Khavari P.A. // Science. 2014. V. 346. № 6212. P. 941–945.
- Scarrit M.E., Pashos N.C., Bunnell B.A. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2015. V. 3. P. 43.
- Tan J.K.H., Watanabe T. // Adv. Immunol. 2010. V. 105. P. 131–157.
- Cupedo T., Stroock A.D., Coles M.C. // Front. Immunol. 2012. V. 3. P. 1–6.
- Giese C., Demmler C.D., Ammer R., Hartmann S., Lubitz A., Miller L., Müller R., Marx U. // Artif. Organs. 2006. V. 30. № 10. P. 803–808.
- Ali O.A., Huebsch N., Cao L., Dranoff G., Mooney D.J. // Nat. Mater. 2009. V. 8. № 2. P. 151–158.
- Martino M.M., Brkic S., Bovo E., Burger M., Schaefer D.J., Wolff T., Gürke L., Briquez P.S., Larsson H.M., Gianni-Barrera R., et al. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2015. V. 3. P. 45.
- Facchetti F., Blanzuoli L., Ungari M., Alebardi O., Vermi W. // Springer Semin. Immunopathol. 1998. V. 19. № 4. P. 459–478.
- Owen J.J., Jordan R.K., Raff M.C. // Eur. J. Immunol. 1975. V. 5. № 9. P. 653–655.
- Dieu-Nosjean M.-C., Goc J., Giraldo N.A., Sautès-Fridman C., Fridman W.H. // Trends Immunol. 2014. V. 35. № 11. P. 571–580.
- Rodewald H.-R. // Annu. Rev. Immunol. 2008. V. 26. P. 355–388.
- van de Pavert S.A., Mebius R.E. // Nat. Rev. Immunol. 2010. V. 10. № 9. P. 664–674.
- Clark B.R., Keating A. B. Annals of the New York Academy of Sciences. // 1995. V. 700. P. 70–78.
- Anthony B.A., Link D.C. // Trends Immunol. 2014. V. 35. № 1. P. 32–37.
- Tokoyoda K., Zehentmeier S., Chang H.D., Radbruch A. // Eur. J. Immunol. 2009. V. 39. № 8. P. 2095–2099.
- Klein L., Kyewski B., Allen P.M., Hogquist K.A. // Nat. Rev. Immunol. 2014. V. 14. № 6. P. 377–391.
- Koble C., Kyewski B. // J. Exp. Med. 2009. V. 206. № 7. P. 1505–1513.
- Anderson G., Jenkinson E.J. // Nat. Rev. Immunol. 2001. V. 1. № 1. P. 31–40.
- Manley N.R., Richie E.R., Blackburn C.C., Condie B.G., Sage J. // Front. Biosci. 2011. V. 17. P. 2461–2477.
- Bajénoff M., Egen J.G., Koo L.Y., Laugier J.P., Brau F., Glaichenhaus N., Germain R.N. // Immunity. 2006. V. 25. № 6. P. 989–1001.
- Malhotra D., Fletcher A.L., Turley S.J. // Immunol. Rev. 2013. V. 251. № 1. P. 160–176.
- Junt T., Scandella E., Ludewig B. // Nat. Rev. Immunol. 2008. V. 8. № 10. P. 764–775.
- Eberl G., Lochner M. // Mucosal Immunol. 2009. V. 2. № 6. P. 478–485.
- Newberry R.D. // Curr. Opin. Gastroenterol. 2008. V. 24. № 2. P. 121–128.
- Forchielli M.L., Walker A.W. // Br. J. Nutr. 2005. V. 93. Suppl 1. P. S41–S48.
- Mowat A.M. // Nat. Rev. Immunol. 2003. V. 3. № 4. P. 331–341.
- Randall T.D., Carragher D.M., Rangel-Moreno J. // Annu. Rev. Immunol. 2008. V. 26. P. 627–650.

33. Buettner M., Pabst R., Bode U. // *Trends Immunol.* 2010. V. 31. № 2. P. 80–86.
34. Alimzhanov M.B., Kuprash D.V., Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L., Tarakhovskiy A., Rajewsky K., Nedospasov S.A., Pfeffer K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 17. P. 9302–9307.
35. Cupedo T., Vondenhoff M.F.R., Heeregrave E.J., De Weerd A.E., Jansen W., Jackson D.G., Kraal G., Mebius R.E. // *J. Immunol.* 2004. V. 173. № 5. P. 2968–2975.
36. Rennert P.D., Browning J.L., Hochman P.S. // *Int. Immunol.* 1997. V. 9. № 11. P. 1627–1639.
37. Luther S.A., Ansel M.K., Cyster J.G. // *J. Exp. Med.* 2003. V. 197. № 9. P. 1191–1198.
38. Crivellato E., Vacca A., Ribatti D. // *Trends Immunol.* 2004. V. 25. № 4. P. 210–217.
39. Willard-Mack C.L. // *Toxicol. Pathol.* 2006. V. 34. № 5. P. 409–424.
40. von Adrian U.H., Mempel T.R. // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. V. 3. № 11. P. 867–878.
41. Crotty S. // *Immunity.* 2014. V. 41. № 4. P. 529–542.
42. Chang J.E., Turley S.J. // *Trends Immunol.* 2014. V. 36. № 1. P. 30–39.
43. Allen C.D.C., Cyster J.G. // *Semin. Immunol.* 2008. V. 20. № 1. P. 14–25.
44. Cremasco V., Woodruff M.C., Onder L., Cupovic J., Nieves-Bonilla J.M., Schildberg F.A., Chang J.E., Cremasco F., Harvey C.J., Wucherpfennig K.W., et al. // *Nat. Immunol.* 2014. P. 1–11.
45. Aguzzi A., Kranich J., Krautler N.J. // *Trends Immunol.* 2014. V. 35. № 3. P. 105–113.
46. Banchereau J., Briere F., Christophe C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.-J., Pulendran B., Palucka K. // *Annu. Rev. Immunol.* 2000. № 18. P. 767–811.
47. Steinman R.M. // *Annu. Rev. Immunol.* 1991. V. 9. P. 271–296.
48. Sixt M., Kanazawa N., Selg M., Samson T., Roos G., Reinhardt D.P., Pabst R., Lutz M.B., Sorokin L. // *Immunity.* 2005. V. 22. № 1. P. 19–29.
49. Pappu R., Schwab S.R., Cornelissen I., Pereira J.P., Regard J.B., Xu Y., Camerer E., Zheng Y.-W., Huang Y., Cyster J.G., et al. // *Science.* 2007. V. 316. № 5822. P. 295–298.
50. Matloubian M., Lo C.G., Cinamon G., Lesneski M.J., Xu Y., Brinkmann V., Allende M.L., Proia R.L., Cyster J.G. // *Nature.* 2004. V. 427. № 6972. P. 355–360.
51. Bajénoff M., Egen J.G., Qi H., Huang A.Y.C., Castellino F., Germain R.N. // *Trends Immunol.* 2007. V. 28. № 8. P. 346–352.
52. Link A., Vogt T.K., Favre S., Britschgi M.R., Acha-Orbea H., Hinz B., Cyster J.G., Luther S.A. // *Nat. Immunol.* 2007. V. 8. № 11. P. 1255–1265.
53. Randolph G.J., Angeli V., Swartz M.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. V. 5. № 8. P. 617–628.
54. Acton S.E., Astarita J.L., Malhotra D., Lukacs-Kornek V., Franz B., Hess P.R., Jakus Z., Kuligowski M., Fletcher A.L., Elpek K.G., et al. // *Immunity.* 2012. V. 37. № 2. P. 276–289.
55. Katakai T. // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. P. 200–205.
56. Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., Shimizu A. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 9. P. 6189–6200.
57. Jarjour M., Jorquera A., Mondor I., Wienert S., Narang P., Coles M.C., Klauschen F., Bajénoff M. // *J. Exp. Med.* 2014. V. 211. № 6. P. 1109–1122.
58. Fletcher A.L., Acton S.E., Knoblich K. // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. P. 1–12.
59. Mebius R.E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. V. 3. № 4. P. 292–303.
60. Astarita J.L., Acton S.E., Turley S.J. // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. P. 1–11.
61. Nicenboim J., Malkinson G., Lupo T., Asaf L., Sela Y., Maysel O., Gibbs-Bar L., Senderovich N., Hashimshony T., Shin M., et al. // *Nature.* 2015. V. 522. P. 56–61.
62. Castagnaro L., Lenti E., Maruzzelli S., Spinardi L., Migliori E., Farinello D., Sitia G., Harrelson Z., Evans S.M., Guidotti L.G., et al. // *Immunity.* 2013. V. 38. № 4. P. 782–791.
63. van de Pavert S.A., Olivier B.J., Goverse G., Vondenhoff M.F.R., Greuter M., Beke P., Kusser K., Höpken U.E., Lipp M., Niederreither K., et al. // *Nat. Immunol.* 2009. V. 10. № 11. P. 1193–1099.
64. Bénézech C., White A., Mader E., Serre K., Parnell S., Pfeffer K., Ware C.F., Anderson G., Caamaño J.H. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. № 8. P. 4521–4530.
65. Lu T.T., Browning J.L. // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. P. 47.
66. Yoshida H., Naito A., Inoue J.-I., Satoh M., Santee-Cooper S.M., Ware C.F., Togawa A., Nishikawa S., Nishikawa S.-I. // *Immunity.* 2002. V. 17. № 6. P. 823–833.
67. Bienstock J., McDermott M.R. // *Immunol. Rev.* 2005. V. 206. P. 22–31.
68. Ware C.F. // *Annu. Rev. Immunol.* 2005. V. 23. P. 787–819.
69. Fütterer A., Mink K., Luz A., Kosco-Vilbois M.H., Pfeffer K. // *Immunity.* 1998. V. 9. № 1. P. 59–70.
70. Kuprash D. V., Alimzhanov M.B., Tumanov A. V., Anderson A.O., Pfeffer K., Nedospasov S.A. // *J. Immunol.* 1999. V. 163. № 12. P. 6575–6580.
71. Kuprash D. V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. № 5. P. 1592–1600.
72. Blum K.S., Pabst R. // *J. Anat.* 2006. V. 209. № 5. P. 585–595.
73. Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R.L., Chen J., Lu H., Richmond J., Kaplan D.L. // *Biomaterials.* 2003. V. 24. № 3. P. 401–416.
74. Agapov I.I., Moiseyevich M.M., Vasiljeva T. V., Pustovalova O.L., Kon'kov A.S., Arkhipova A.Y., Sokolova O.S., Bogush V.G., Sevastianov V.I., Debabov V.G., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2010. V. 433. № 5. P. 201–204.
75. Moiseyevich M.M., Pustovalova O.L., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzeev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., et al. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 15. P. 3887–3898.
76. Shapiro L., Cohen S. // *Biomaterials.* 1997. V. 18. № 8. P. 583–590.
77. Perez R.A., Kim M., Kim T.-H., Kim J.-H., Lee J.H., Park J.-H., Knowles J.C., Kim H.-W. // *Tissue Eng.* 2013. V. 20. P. 103–114.
78. Lu T., Li Y., Chen T. // *Int. J. Nanomedicine.* 2013. V. 8. P. 337–350.
79. Мойсенович М.М., Архипова А.Ю., Орлова А.А., Друцкая М.С., Волкова С.В., Захаров С.Е., Агапов И.И., Кирпичников М.П. // *Acta Naturae.* 2014. V. 1. № 20. P. 20–26.
80. Gombotz W.R., Pettit D.K. // *Bioconj. Chem.* 1995. V. 6. № 4. P. 332–351.
81. Li Z., Cui Z. // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 32. № 2. P. 243–254.
82. Uriel S., Labay E., Francis-Sedlak M., Moya M.L., Weichselbaum R.R., Ervin N., Cankova Z., Brey E.M. // *Tissue Eng.* 2009. V. 15. № 3. P. 309–321.
83. Wang Y., Irvine D.J. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 21. P. 4903–4913.
84. Tessmar J.K., Göpferich A.M. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007. V. 59. P. 274–291.
85. Ali O.A., Emerich D., Dranoff G., Mooney D.J. // *Sci. Transl. Med.* 2009. V. 1. № 8. P. 1–22.
86. Zavala V.A., Kalergis A.M. // *Immunology.* 2015. V. 145. P. 182–201.
87. Tomei A.A., Siegert S., Britschgi M.R., Luther S.A., Swartz

- M.A. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 7. P. 4273–4283.
88. He C., Young A.J., West C.A., Su M., Konerding M.A., Mentzer S.J. // *J. Appl. Physiol.* 2002. V. 93. № 3. P. 966–973.
89. Okamoto N., Chihara R., Shimizu C., Nishimoto S., Watanabe T. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. № 4. P. 997–1007.
90. Suematsu S., Watanabe T. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 12. P. 1539–1545.
91. Nakashima M., Mori K., Maeda K., Kishi H., Hirata K., Kawabuchi M., Watanabe T. // *Eur. J. Immunol.* 1990. V. 20. № 1. P. 47–53.
92. Bredenkamp N., Ulyanchenko S., O’Neill K.E., Manley N.R., Vaidya H.J., Blackburn C.C. // *Nat. Cell Biol.* 2014. V. 16. № 9. P. 902–908.
93. Richardson T.P., Peters M.C., Ennett A.B., Mooney D.J. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 11. P. 1029–1034.
94. Sasai Y. // *Stem Cell.* 2013. V. 12. № 5. P. 520–530.
95. Forster R., Chiba K., Schaeffer L., Regalado S.G., Lai C.S., Gao Q., Kiani S., Farin H.F., Clevers H., Cost G.J., et al. // *Stem Cell Reports.* 2014. V. 2. № 6. P. 838–852.
96. Watson C.L., Mahe M.M., Múnera J., Howell J.C., Sundaram N., Poling H.M., Schweitzer J.I., Vallance J.E., Mayhew C.N., Sun Y., et al. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 11. P. 1310–1314.
97. Bredenkamp N., Jin X., Liu D., O’Neill K.E., Manley N.R., Blackburn C.C. // *Regen. Med.* 2015. V. 10. № 3. P. 317–329.