

рованную к дальнейшей дифференцировке. Таким образом, «бессмертная» цепь рассматривается как идеальная матрица, хранящаяся в стволовой клетке на протяжении всей жизни организма. Хотя асимметричная сегрегация ДНК была обнаружена лишь в некоторых стволовых клетках беспозвоночных и позвоночных животных, а значение этого явления до конца не ясно, интересным представляется вопрос о том, как соотносятся между собой оба процесса — удержание «бессмертной» генетической матрицы и сохранение «бессмертной» центриоли [9]. Хотя первые свидетельства такой взаимосвязи уже получены (например, [10]), окончательный ответ на этот вопрос — дело дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Morrison S.J., Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006; 441(7097): 1068–74.
2. Wodarz A., Huttner W.B. Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech. Dev.* 2003; 120(11): 1297–309.
3. Cheng J., Turkel N., Hemati N. et al. Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature* 2008; 456(7222): 599–604.
4. Yamashita Y.M., Mahowald A.P., Perlin J.R., Fuller M.T. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* 2007; 315(5811): 518–21.
5. Rebollo E., Sampaio P., Januschke J. et al. Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell.* 2007; 12(3): 467–74.
6. Rusan N.M., Peifer M. A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J. Cell Biol.* 2007; 177(1): 13–20.
7. Bettencourt-Dias M., Glover D.M. Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

В заключение следует отметить, что значимость центросомных компонентов в регуляции процессов эмбрионального нейрогенеза у млекопитающих, детальное молекулярное обоснование которой предложено в работе Wong с соавт., также согласуется со сведениями о генетических нарушениях нейрогенеза у человека. Действительно, гены, вовлеченные в развитие ауто-сомно-рецессивной формы первичной микроцефалии (наследственного заболевания, характеризующегося уменьшением объема головного мозга в результате дефектов эмбрионального нейрогенеза; MIM 251200), кодируют центросомные белки, среди которых MCPH1, CDK5RAP2, ASPM, CENPJ и STIL [11–13].

2007; 8(6): 451–63.

8. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975; 255(5505): 197–200.

9. Tajbakhsh S., Gonzalez C. Biased segregation of DNA and centrosomes: moving together or drifting apart? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10(11): 804–10.

10. Shinin V., Gayraud-Morel B., Gomes D., Tajbakhsh S. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8(7): 677–87.

11. Bond J., Roberts E., Springell K. et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.* 2005; 37(4): 353–5.

12. Zhong X., Liu L., Zhao A., Pfeifer G.P., Xu X. The abnormal spindle-like, microcephaly-associated (ASPM) gene encodes a centrosomal protein. *Cell Cycle* 2005; 4(9): 1227–9.

13. Zhong X., Pfeifer G.P., Xu X. Microcephalin encodes a centrosomal protein. *Cell Cycle* 2006; 5(4): 457–8.

Подготовил А.В. Леявский

По материалам: Wang X., Tsai J.W., Imai J.H. et al. *Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. Nature* 2009; 461 (7266): 947–55

Nanog — ключевой фактор на финальных стадиях формирования плюрипотентного статуса

Ученые из Великобритании — Остин Смит (Austin Smith) и Ян Чемберс (Ian Chambers) несколько лет плодотворно сотрудничают, исследуя плюрипотентные клетки и, в частности, роль гомеобоксного белка Nanog. Шесть лет назад они вместе с коллегами из Эдинбургского университета впервые охарактеризовали этот транскрипционный фактор [1]. Независимо и одновременно с ними показали особую роль Nanog в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) японские исследователи во главе с Синья Яманака (Shinya Yamanaka) [2]. Хотя приоритета в открытии Nanog у британцев нет, своим необычным названием этот фактор обязан шотландцу по происхождению Яну Чемберсу. Ян Чемберс назвал его Nanog в честь кельтской мифической земли вечной юности — Tír na nÓg.

Экспрессия Nanog является специфичной для плюрипотентных клеток. Кроме клеток внутренней клеточной массы и эмбриональных стволовых клеток Nanog обнаружен только в развивающихся герминативных тканях млекопитающих. Делеция Nanog приводит к ранней доимплантационной гибели эмбриона, а его сверхэкспрессия в мышечных ЭСК — к автономии от цитокина LIF при культивировании [2]. Согласно устоявшемуся мнению,

Nanog наряду с такими факторами, как Oct4 и Sox2, находится в центре транскрипционной сети плюрипотентной клетки [3]. Повышение экспрессии Nanog делает более эффективным перепрограммирование путем слияния ЭСК и нейральных стволовых клеток [4]. Несмотря на это, Nanog не входит в каноническую четверку транскрипционных факторов Oct4, Sox2, c-Myc, и Klf4, трансфекция которыми приводит к перепрограммированию соматических клеток и получению клеток с индуцированной плюрипотентностью (iPS клетки). Некоторым противоречием является и тот факт, что, занимая одно из ключевых мест в иерархии регуляторных генов плюрипотентности, Nanog экспрессируется в ЭСК со значительной вариабельностью — вплоть до полного отсутствия экспрессии в отдельных клетках. Более того, делеция гена Nanog в ЭСК не приводит к переключению к дифференцировке, а лишь к получению линии ЭСК, имеющей повышенную склонность «уходить» в дифференцировку, но в норме обладающих всеми признаками плюрипотентности [5].

В осеннем номере журнала *Cell* опубликованы результаты исследования, проведенного с участием трех первооткрывателей Nanog Остина Смита, Яна Чемберса

и Синъя Яманака, уточняющего его роль [6]. Данная работа показывает, что Nanog нужен на финальных стадиях формирования плюрипотентного статуса, когда все остальные ключевые факторы плюрипотентности уже активированы. Экспрессия Nanog равно необходима как в конце процесса получения iPS клеток, так и для формирования пула плюрипотентных клеток в мышином эмбрионе.

Авторы пользуются весьма широким диапазоном методов, из которых наиболее показательным является демонстрация необходимости Nanog для перехода от недифференцированного состояния клеток к плюрипотентности при соматическом перепрограммировании нейтральных стволовых (НС) клеток. В своей предыдущей работе авторы разработали метод перепрограммирования НС клеток, в котором наряду с трансфекцией факторами Oct4, Klf4 и c-мус используются ингибиторы двух киназ: митоген-ассоциированной протеинкиназы и GSK-3 киназы [7]. При таком подходе можно разделить процесс индукции плюрипотентности на две стадии. При трансфекции транскрипционными факторами происходит дедифференцировка, но отсутствует реактивация X-хромосомы в женских клетках, нет устойчивой экспрессии Oct4 и Nanog, нет способности формировать ткани взрослого химерного организма. При последующем вводе в среду ингибиторов вышеуказанных киназ и LIF происходит окончательное приобретение всех признаков плюрипотентной клетки. В текущей работе было использовано две линии клеток: линия НС клеток с делетированным Nanog и эта же линия, в клетки которой введен конститутивно-экспрессирующийся вектор с Nanog. При трансфекции Oct4, Klf4 и c-мус происходила успешная дедифференцировка клеток обеих линий, а введение ингибиторов и LIF приводило к завершению только у экспрессирующей Nanog линии.

Вторая, хотя и не последняя, линия доказательств включала наблюдение за экспрессией Nanog и Oct4, а также статусом X хромосомы между 3 и 5 сут. эмбрионального развития мышины самки. В этих исследованиях проводили сравнение развития эмбрионов с генотипом $\text{nanog}^+/\text{nanog}^+$, $\text{nanog}^+/\text{nanog}^-$ и $\text{nanog}^-/\text{nanog}^-$. Как известно, для всех линий ЭСК мыши характерен активный статус обеих хромосом у клеток с кариотипом 40XX, а такой статус X-хромосом является одной из определяющих характеристик клеточной плюрипотентности у самок мышей. В качестве эпигенетического маркера неактивной X-хромосомы использовали Eed-белок.

О наличии молчащей X-хромосомы свидетельствует присутствие в клеточном ядре яркого фокуса при ИГХ-окрашивании с использованием антител к Eed. До 3,5 сут. развития эмбрионы с различным генотипом не имели различий в морфологии, а во всех клетках выявлялся фокус окрашивания Eed. На 4,5 сут. происходила реактивация X-хромосомы только в тех эмбрионах, которые имели ген Nanog. Реактивация X-хромосомы была обнаружена только в тех клетках, которые экспрессируют не только Oct4, но и Nanog, и такие клетки занимают центральное положение во внутренней клеточной массе бластоцисты, т.е., по мнению авторов, соответствуют эпобласту. Эмбрионы $\text{nanog}^-/\text{nanog}^-$ имели сниженное количество клеток во внутренней клеточной массе, и у них отсутствовал компартмент эпобласта.

Эти и другие свидетельства, приведенные в статье, говорят о том, что Nanog необходим на окончательной стадии формирования плюрипотентного статуса клеток как при нормальном эмбриональном развитии, так и при соматическом перепрограммировании. При этом экспрессия Nanog не является принципиальной ни на первых этапах становления плюрипотентности, ни по завершении этого процесса. Авторы исследования считают, что Nanog координирует уже существующую активность ключевых генов и белков, заставляя их работать в согласованном режиме, что обуславливает переход к самоподдерживающемуся состоянию плюрипотентности. Аналогией, которой пользуются авторы для описания роли Nanog, является роль дирижера или хореографа. Следующей задачей, которую ставят для себя исследователи, является изучение способа, которым Nanog осуществляет подобное управление.

Следует отметить, что приведенные в статье факты относятся только к мыши. Интересно, насколько выводы, сделанные авторами в отношении роли Nanog, применимы к плюрипотентным клеткам человека. В частности, существуют данные, что в отличие от мышиных клеток, добавление Nanog к факторам Oct4, Sox2, c-Мус, и Klf4 повышает эффективность получения iPS клеток человека [8], что может говорить о более раннем участии Nanog в процессе перепрограммирования соматических клеток человека. Как бы то ни было, данная работа не только проясняет функциональную роль Nanog, но и демонстрирует удивительную зеркальность финальных процессов, которые происходят при естественном возникновении плюрипотентных клеток в бластоцисте и при их искусственном получении в виде iPS клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113(5): 643–55.
2. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113(5): 631–42.
3. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6): 947–56.
4. Silva J., Chambers I., Pollard S., Smith A. Nanog promotes transfer

of pluripotency after cell fusion. *Nature* 2006; 441(7096): 997–1001.

5. Chambers I., Silva J., Colby D. et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007; 450(7173): 1230–4.

6. Silva J., Nichols J., Theunissen T.W. et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009; 138(4): 722–37.

7. Silva J., Barrandon O., Nichols J. et al. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 2008; 6(10): e253.

8. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917–20.

Подготовила А.Н. Богомазова

По материалам: Silva J., Nichols J., Theunissen T.W. et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009; 138(4): 722–37

Молекулярные механизмы «старения» миосателлитоцитов

Детализация возрастных изменений функциональной активности организма на клеточном уровне имеет принципиальное значение для развития клеточных технологий: изменения количественного и качественного состава клеточных популяций, их регенераторных потенций, восприимчивости к регуляторным влияниям и прочие аспекты функционирования должны быть установлены и изучены для эффективного использования клеточного материала в рамках биотехнологического направления. В этой связи исследования, нацеленные на сравнение различий функциональных особенностей клеток в зависимости от возраста доноров, весьма многочисленны, однако остаются несистематизированными.

Более глобальной причиной активного изучения возрастных изменений, происходящих на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях, является установление механизмов старения. В частности, широко известным является факт возрастного ухудшения функционального состояния скелетной мускулатуры, проявляющийся в мышечной атрофии и замещении мышечных волокон соединительной тканью, частично обусловленный системными нарушениями (со стороны нервной и сердечнососудистой систем) [1], но, по всей видимости, связанный также со снижением активности местных регенераторных процессов.

Согласно наиболее распространенной теории, основным клеточным источником, реализующим процессы физиологической и репаративной регенерации поперечнополосатой мышечной ткани, является популяция миосателлитоцитов, способных к пролиферации и последующей дифференцировке в миообласты, сливающихся в мышечные симпласты [2]. В этой связи, характерные дегенеративные изменения мышечной ткани могут быть обусловлены снижением количества или функциональной активности миосателлитоцитов [3]. Данные о вариативности их количественного состава крайне противоречивы: одни авторы говорят о закономерном возрастном снижении численности миосателлитоцитов [4], другие — о практически неизменном их количестве [5]. В части, касающейся закономерного снижения пролиферативных и дифференцировочных потенций миосателлитоцитов, значимых расхождений во мнениях и результатах исследований нет [4–6], но механизмы клеточного и субклеточного уровней в полной мере не определены.

В этой связи значительный интерес представляют результаты исследования I. Conboy с соавт., частично раскрывающие молекулярные механизмы, ответственные за возрастное ухудшение функционального состояния скелетной мускулатуры. В работе приняли участие 21 человек (10 возрастом около 22 лет и 11 — со средним возрастом 71 год), которые были разделены по возрастному критерию на две группы. Гипотрофия латеральной широкой мышцы бедра была индуцирована временной иммобилизацией нижних конечностей (в течение 2 нед.), после чего в течение 4 нед. задавалась интенсивная физическая нагрузка. Биопсии из средней части латеральной головки четырехглавой мышцы бедра выполнялись непосредственно перед и после иммобилизации, а также спустя первые 3 сут. восстановительного периода и на момент его окончания через 4 нед.

На первом этапе исследования было показано, что исходно количество мышечных волокон у пожилых людей меньше, чем у молодых. В ходе индукции гипотрофии дегенерация скелетной мышечной ткани носила более выраженный характер, в периоде восстановления наблюдался постоянный воспалительный процесс и склерозирование, в то время как у лиц возрастом около 22 лет определялась лишь умеренная гипотрофия и быстрое возвращение мышечной ткани к исходному морфофункциональному состоянию. Данные гистологического анализа были сопоставимы с результатами функциональных проб, показавших быстрое восстановление силы и выносливости гипотрофированных мышц до исходного уровня после устранения иммобилизации в группе молодых людей, в противоположность пожилым.

В дальнейшем, чтобы определить ключевые клеточные механизмы, ответственные за возрастное снижение регенеративных потенций поперечнополосатой мышечной ткани, авторы определяли удельную численность популяции миосателлитоцитов. Клетки идентифицировали определением фактора транскрипции Pax7, M-кадгерина и молекулы адгезии нейтральных клеток. Было установлено, что количество миосателлитоцитов в группе пожилых вдвое меньше, чем в группе молодых людей. Важно, что незначительное увеличение количества этих клеток в течение двух недель иммобилизации сменялось четырехкратным снижением в течение восстановительного периода, что позволило авторам постулировать об ухудшении активации миосателлитоцитов с возрастом в ответ на повреждение/гипотрофию.

Показав ранее значимость сигнального пути Delta/Notch в индукции регенераторных потенций миосателлитоцитов [7], исследователи определяли уровень экспрессии клетками Notch и одного из его лигандов — Delta. Оказалось, что до иммобилизации их содержание в миосателлитоцитах было низким в обеих группах, однако с началом регенераторных процессов экспрессия в группе молодых людей значительно возрастала, а в случае пожилых — оставалась практически неизменной, что свидетельствует об изменении активности сигнального пути Delta/Notch с возрастом.

Для более детального изучения молекулярных механизмов, снижающих функциональную активность миосателлитоцитов в процессе старения, авторы показали, что клетки группы пожилых людей характеризуются более высоким уровнем экспрессии трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) и его транскрипционного фактора pSmad3, которые ответственны за снижение продукции Notch. Кроме того, TGF- β индуцирует повышение экспрессии p15 и p21 — ингибиторов циклин-зависимых киназ (cyclin-dependent kinase (CDK)), за счет чего, по всей видимости, снижается пролиферативная активность миосателлитоцитов. Снижение регенераторных потенций миосателлитоцитов, даже полученных от молодых доноров, под действием TGF- β было показано авторами и в эксперименте *in vitro* при добавлении фактора роста в культуральную среду. При этом инкубирование «старых» миосателлитоцитов в кондиционированной «молодыми» клетками среде приводило к статистически значимому



увеличению их пролиферативной активности, а при обратной постановке эксперимента — к снижению регенераторных потенциалов миосателлитов группы молодых людей.

В заключение, исследователи подтвердили положительное регулирующее влияние митоген-активированной протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase, MAPK) на экспрессию генов, характерную для эмбрионального периода [8]. Внесение в культуральную среду агониста MAPK — фактора роста фибробластов-2, приводило к повышению продукции Delta и Notch и активации пролиферативных потенциалов клеток, полученных даже от пожилых людей, а введение антагониста — MAPK ингибитора — к снижению экспрессии Delta и Notch. В подтверждение реализации эффектов сигнального пути MAPK через Notch было показано, что положительное

влияние агонистов MAPK на пролиферативную активность миосателлитов нивелируется введением ингибитора гамма-секретазы (gamma secretase inhibitor). Непосредственное введение в культуральную среду эндогенного Delta также приводило к активации регенераторного ответа миосателлитов группы пожилых людей.

Таким образом, молекулярные механизмы, ответственные за процесс снижения регенераторных потенциалов миосателлитов с возрастом, чрезвычайно сложны. Можно с уверенностью утверждать, что авторы в ходе ряда исследований выявили и обосновали один из них, общий для человека и животных, в который вовлечены MAPK, Delta/Notch, pSmad3/TGF- β , ингибиторы циклин-зависимых киназ, что может найти практическое применение в клеточных технологиях.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Grounds M.D. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998; 854: 78–91.
2. Данилов Р.К. Источники развития миоцитов при регенерации скелетных мышц. *Онтогенез* 1983; 14(5): 551–5.
3. Carlson M.E., Suetta C., Conboy M.J. et al. Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Molecular Medicine* 2009; 1: 381–91.
4. Gibson M.C., Schultz E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve* 1983; 6(8): 574–80.

5. Collins C.A., Zammit P.S., Ruiz A.P. et al. A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. *Stem Cells* 2007; 25(4): 885–94.

6. Schultz E., Lipton B.H. Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech. Ageing Dev.* 1982; 20(4): 377–83.

7. Conboy I.M., Conboy M.J., Smythe G.M. et al. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 2003; 302: 1575–7.

8. Carmona A., Buff E., Halfon M.S. et al. Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev. Biol.* 2002; 244: 226–42.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Carlson M.E., Suetta C., Conboy M.J. et al. Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Molecular Medicine* 2009; 1: 381 – 91

Направленное клеточное перепрограммирование является стохастическим процессом и подвержено акселерации

Процесс перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные *in vitro* является достаточно сложным для изучения. Наиболее проблематично оценить количественные характеристики и временные рамки происходящих критических событий. Причиной этого является клеточная и генетическая гетерогенность полученных *de novo* трансформированных соматических клеток. Для того, чтобы обойти необходимость вирусной трансдукции и уменьшить гетерогенность экспрессии перепрограммирующих факторов, была изобретена «вторичная» перепрограммирующая трансгенная система, в которой все соматические клетки обладают одинаковым паттерном интеграции препарат-индуцируемых вирусных трансгенов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc [1–3].

Используя эту систему на клетках линии В-лимфоцитов Nanog-GFP репортерных мышей, коллектив исследователей из Whitehead Institute for Biomedical Research и Massachusetts Institute of Technology взялся решить ряд актуальных вопросов эпигенетики:

— как происходит развитие процесса перепрограммирования генетической системы клеток в течение времени и что происходит с преобладающим количеством

клеток, которые не становятся перепрограммированными в течение продолжительных клеточных делений на фоне экспрессии перепрограммирующих факторов?

— за счет чего некоторые соматические клетки, обошедшие механизмы клеточного старения и апоптоза в результате экспрессии Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, превращаются в индуцированные плюрипотентные стволовые (iPS) клетки раньше других?

— все ли взрослые донорские клетки, экспрессирующие факторы Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, в конечном счете станут iPS-клетками, или это может быть достигнуто за счет дополнительных генетических или молекулярных манипуляций?

— ограничена ли высокая перепрограммирующая способность только для клеток, не принадлежащих к каким-либо линиям дифференцировки, и взрослым стволовым клеткам?

Авторы исследовали характеристики процесса перепрограммирования путем изменения генетической программы клеток. Было использовано индуцированное выключение ряда генов с помощью метода малых интерферирующих РНК. В ходе экспериментов проводился по-

стоянный контроль экспрессии факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Генами-мишенями для выключения были выбраны p53 и p21. Белок p21, который является основной эффекторной мишенью p53, регулирует прогрессию клеточного цикла и является ингибитором циклин-зависимых киназ. Также было оценено влияние гиперэкспрессии гена Lin28, усиливающего перепрограммирование фибробластов человека и действующего как онкоген, модулирующий экспрессию регуляторов клеточного цикла.

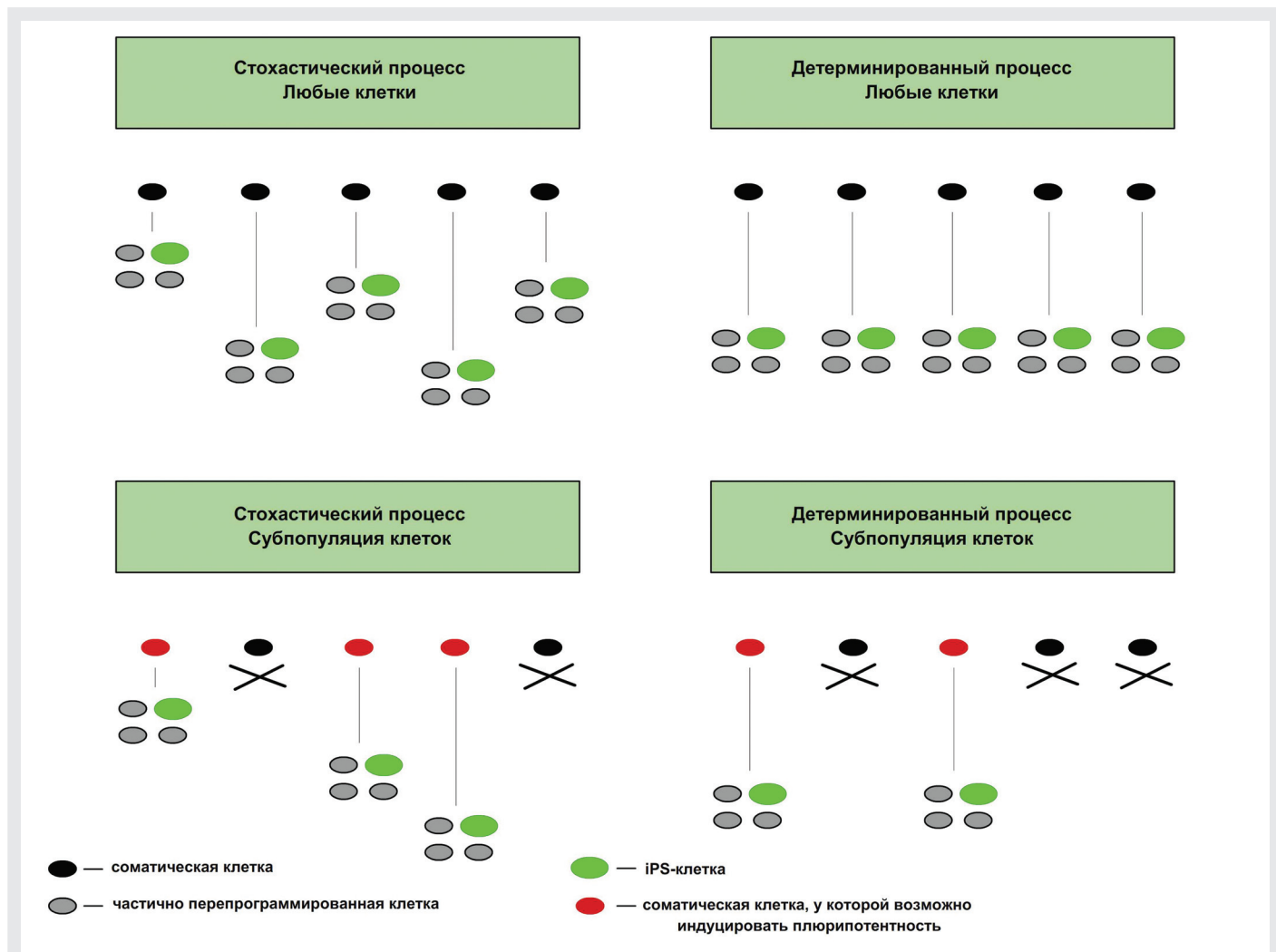
В результате оказалось, что совместное выключение (нокаун) обоих генов p53 и p21, или гиперэкспрессия Lin28 ускоряют процесс перепрограммирования, увеличивая совокупную вероятность скорейшего возникновения стохастических событий. Оказывается, в случае ингибирования p53/p21 задействован механизм, зависящий от уровня пролиферации клеток. Механизм действия белка Lin28 несколько иной — акселерация появления iPS-клеток проявляется за счет более быстрого увеличения клеточной популяции в результате сокращения продолжительности времени клеточного цикла и ускоренного деления клеток.

Следующим шагом стало исследование влияния на перепрограммирование клеток гена Nanog, являющегося фактором плюрипотентности и экспрессирующегося во время эмбрионального развития в клетках внутренней

клеточной массы бластоцисты. Эмбриональные стволовые клетки и iPS-клетки нуждаются в присутствии функциональной эндогенной аллели Nanog [4].

Установлено, что усредненное число клеточных делений до появления iPS-клеток существенно снизилось с 70 у контроля и линий с выключенными генами p53 и p21 до 50 делений у линии с гиперэкспрессией Nanog. Такие данные позволяют сделать вывод о том, что гиперэкспрессия Nanog ускоряет кинетику перепрограммирования за счет внутриклеточных механизмов, независимых от уровня клеточной пролиферации. Авторы отмечают, что дальнейшее изучение молекулярного механизма, за счет которого белок Nanog управляет системой поддержания плюрипотентности клеток, представляет несомненный интерес.

Следует отметить, что число клеточных делений, необходимых для получения iPS-клеток, не является ключевым параметром при использовании других стратегий перепрограммирования. В случае переноса ядра соматической клетки в яйцеклетку ген Oct4, являющийся маркером плюрипотентности и молчащий в соматическом ядре, реактивируется в течение 1–2 клеточных делений [5–6]. Это свидетельствует о том, что в цитоплазме яйцеклетки содержатся пока неизвестные детерминанты, посредством которых стойкое перепрограммирование достигается за единичные клеточные циклы [7].



Модели возникновения индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток



В результате исследований оказалось возможным сделать следующие выводы:

1) перепрограммирование соматических клеток в плюрипотентные является стохастическим процессом, при этом практически все соматические клетки имеют возможность стать iPS-клетками при непрерывном делении на фоне экспрессии факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc;

2) хотя перепрограммированные клетки появляются не ранее чем на 8–10-е сут. экспрессии Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc [8], время экспозиции в доксициклине (запускающем экспрессию лентивирусного вектора с факторами Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc) и число клеточных делений, прошедших до появления популяции клонов iPS-клеток, сильно варьирует;

3) данные исследования не подтверждают гипотезу «элитных компонентов» для перепрограммирования клеток [9]: большинство, если не все, клеток линии В-лимфоцитов и моноцитов с устойчивой экспрессией всех четырех факторов перепрограммирования оказалось способно произвести iPS-клетки;

4) соматические клетки перепрограммируются с реализацией различных латентностей, что не может быть объяснено только разницей в темпе пролиферации и временем экспозиции в доксициклине. Подтверждается участие неопределенных стохастических событий, происходящих во время процесса перепрограммирования клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P. et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008; 133: 250–64.
2. Wernig M., Lengner C., Hanna J. et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nature Biotechnol.* 2008; 26: 916–24.
3. Markoulaki S., Hanna J., Beard C. et al. Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors. *Nature Biotechnol.* 2009; 27: 169–71.
4. Silva J., Nichols J., Theunissen T. et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009; 138: 722–37.
5. Boiani M., Gentile L., Gambles V. et al. Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct

developmental potentials in different culture environments. *Stem Cells* 2005; 23: 1089–104.

6. Egli D., Rosains J., Birkhoff G., Eggan K. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 2007; 447: 679–85.

7. Egli D., Birkhoff G., Eggan K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2008; 9: 505–16.

8. Brambrink T., Foreman R., Welstead G. et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 151–9.

9. Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009; 460: 49–52.

Подготовил А.В. Иванов

По материалам: Hanna J., Saha K., Pando B. et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 2009; 462: 595–601

Первая успешная попытка создания искусственной кожи человека с использованием эмбриональных стволовых клеток

Более двух десятилетий исследователи и клиницисты пытаются разработать метод лечения, который гарантировал бы эффективное восстановление кожных покровов пациентам, получившим тяжелые ожоговые и травматические повреждения либо страдающим трофическими язвами различной этиологии. На сегодняшний день наиболее эффективной является операция ауто-трансплантации кожи. В перспективе, на смену ей может прийти ауто-трансплантация выделенных из биоптатов неповрежденных участков кожи и размноженных в культурах *in vitro* клеток-предшественниц кератиноцитов на трехмерных матриксах [1]. Главным недостатком этого подхода остается то, что на экспансию кератиноцитов в культурах *in vitro* перед трансплантацией требуется около 3 недель [2]. В течение всего этого времени пациент подвергается риску инфицирования и обезвоживания открытой ожоговой раны. Недели перед проведением ауто-трансплантации остаются тем критическим периодом, в котором необходимо обеспечить максимальную защиту поврежденных покровов. В качестве временного покрова возможно использование децеллюляризованного трупного кожного лоскута, однако доступность по-

добного материала ограничена, а его применение нередко приводит к развитию реакций воспаления.

Чтобы избежать применения временных трансплантатов и операций ауто-трансплантации, предпринимается множество попыток разработки «эквивалентов кожи» на основе инертных синтетических и тканеинженерных матриксов, обычно содержащих коллаген I типа и аллогенные клетки (дермальные фибробласты и реже — фибробласты и кератиноциты) [3]. Однако до настоящего времени ни один из этих продуктов не продемонстрировал высокой эффективности в лечении пациентов с обширными глубокими ожогами [4].

Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека могло бы стать решением проблемы создания эквивалентов кожи, пригодных для трансплантации, позволив получать необходимые типы клеток (дермальные фибробласты и кератиноциты) в неограниченном количестве. Основным препятствием использования данного подхода остается недостаточная эффективность протоколов дифференцировки ЭСК в требующиеся типы клеток и потенциальная туморогенность ЭСК [5–7]. Единственная оставшаяся в предназначенной для

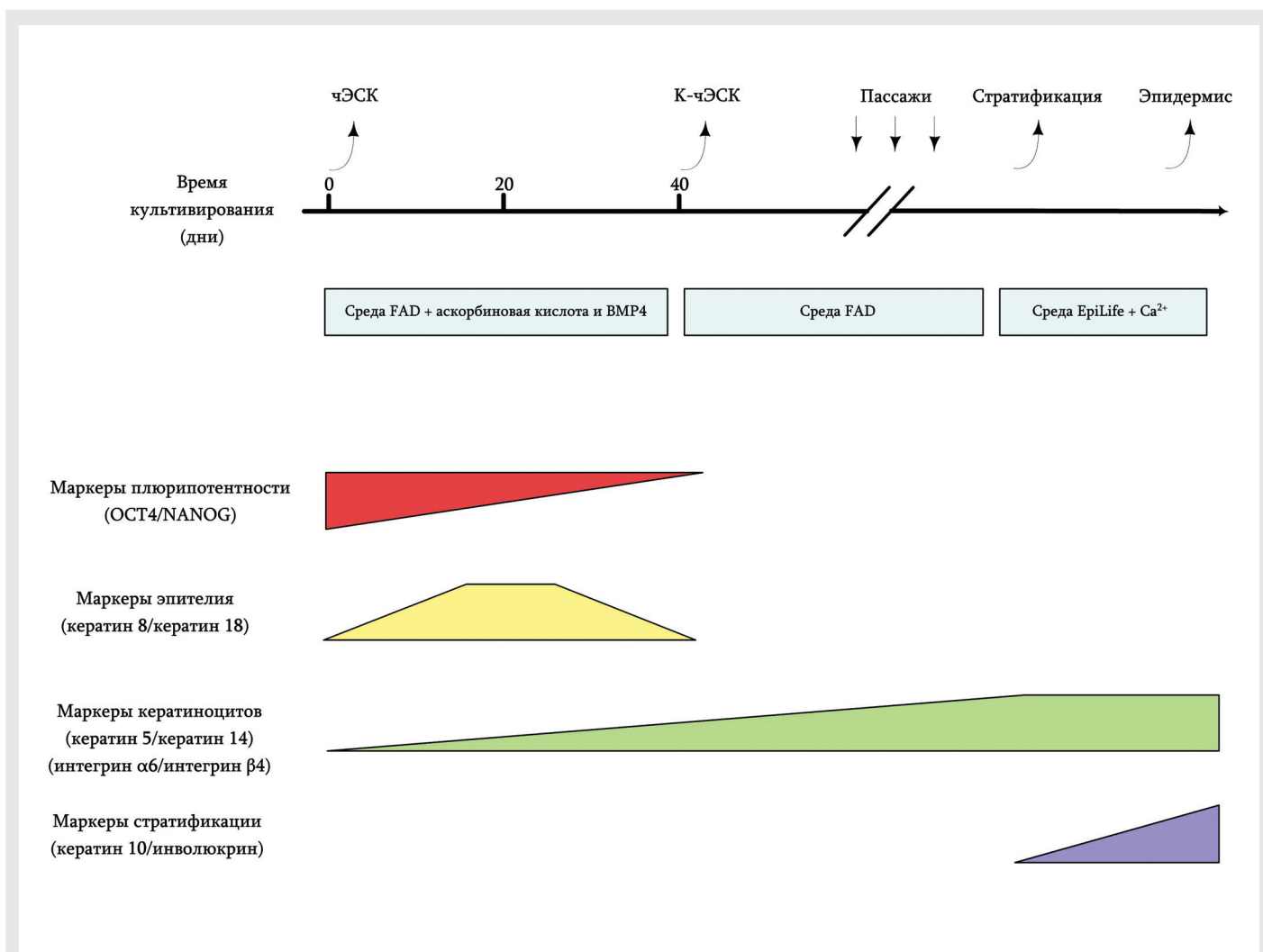
клинического использования клеточной культуре недифференцированная эмбриональная стволовая клетка теоретически может привести к формированию у реципиента тератомы — опухоли, развивающейся из ЭСК при их трансплантации.

В 2003 г. были впервые получены фрагменты кожи на основе кератиноцитов, дифференцированных из ЭСК мыши [8]. С тех пор предпринималось множество попыток разработки протокола дифференцировки ЭСК человека в кератиноциты, однако полученные клетки по неясным причинам не были способны к активной пролиферации [9]. Основная задача этих исследований — создание функционального стратифицированного эпидермиса с базальным слоем, содержащим малодифференцированные клетки-предшественники кератиноцитов, — до настоящего времени так и не была решена [9–11].

В журнале The Lancet были опубликованы результаты работы научной группы, возглавляемой профессором С. Baldeschi. Исследователям впервые удалось получить эквиваленты кожи, аналогичные по своей структуре нормальной коже человека. В своей работе ученые создали протокол дифференцировки, моделирующий длительный многоступенчатый процесс дифференцировки клеток внутренней клеточной массы бластоцисты

в базальные кератиноциты эмбриона. Ключевым звеном этого протокола оказалось время, в течение которого клетки культивировали в среде, содержащей индукторы дифференцировки. Интересно отметить, что до этого ученые многие годы не обращали внимания на временные параметры, сосредоточившись на разнообразных химических индукторах дифференцировки [9–12].

ЭСК человека линий H9 и SA01 культивировали на фидерном слое инактивированных эмбриональных фибробластов мыши в течение 40 суток в питательной среде, содержащей 0,5 ммоль/л BMP4 (bone morphogenetic protein 4) и 0,3 ммоль/л аскорбиновой кислоты. В течение первых 20 суток культивирования в клетках постепенно снижалась экспрессия эмбриональных маркеров Oct4 и Nanog, а к 40 суткам прекращалась экспрессия маркера SSEA3, что было подтверждено количественным ПЦР-анализом, флуоресцентно-активированным клеточным сортированием (FACS) и методом иммуноцитохимии. Параллельно с утратой эмбриональных маркеров в ЭСК происходила последовательность молекулярных событий, аналогичная происходящей в клетках развивающихся эмбриональных покровов [13–15]. В течение первых 10 суток нарастала продукция кератинов 8 и 18, после чего она начинала снижаться, сменяясь продукцией кератинов 5, 14 и 18. К 40 суткам в клетках



Схематическая презентация протокола дифференцировки чЭСК в кератиноциты. К-чЭСК — кератиноциты, полученные из чЭСК

активно продуцировались кератины 5 и 14, а экспрессия кератина 18 прекращалась. В контрольных культурах нормальных базальных кератиноцитов человека наблюдался аналогичный паттерн экспрессии кератинов, более того, в базальных кератиноцитах и кератиноцитах, полученных из ЭСК (К-ЭСК), совпадала и внутриклеточная локализация данных маркеров. Единственное отличие двух типов клеток заключалось в том, что в К-ЭСК не было отмечено экспрессии антигенов HLA-ABC и HLA-DR.

Эффективность дифференцировки в базальные кератиноциты была одинаковой для обеих использованных линий ЭСК и составляла около 95%. После селекции клетки были высеяны на фибриновый матрикс, заселенный дермальными фибробластами человека. После того, как монослой К-ЭСК на поверхности матрикса достигал конfluence, полученные «кожные» лоскуты трансплантировали мышам с иммунодефицитом (nu/nu, n=5). Через 10–12 недель после трансплантации образцы ткани фиксировали и оценивали иммуногистохимическим методом на присутствие специфических маркеров дифференцировки кератиноцитов. Следует отметить, что ни у одного из животных не было выявлено развития опухолей.

Было показано, что К-ЭСК формируют нормальный стратифицированный эпителий. В базальном слое наблюдали экспрессию кератинов 5 и 14, интегринов $\alpha 6$ и $\beta 4$, коллагена VII типа и ламинина 5. В слоях, лежащих над базальным, обнаруживался кератин 10, а инволюктин и филаггрин — маркеры терминальной дифференцировки кератиноцитов, — продуцировались только

в верхних слоях эпидермиса. Структура и плотность образовавшихся покровов также повторяла структуру и плотность нормальной кожи человека. При этом в базальном слое происходила пролиферация клеток, что было подтверждено иммуногистохимической реакцией на маркер Ki-67. Таким образом, полученная искусственная кожа была способна к обновлению.

Авторы этой работы уверены, что полученные ими эквиваленты кожи в будущем могут успешно применяться в качестве временных покровов, защищающих открытые раны перед предстоящей ауто трансплантацией. Возможно, они также смогут стать полноценной заменой ауто трансплантатов. Самоподдерживающиеся линии ЭСК решают проблему доступности материала, а низкая экспрессия молекул HLA на мембране полученных К-ЭСК должна свести к минимуму вероятность развития иммунных реакций при использовании трансплантата.

Выполненных на сегодняшний день экспериментов недостаточно для внедрения полученного продукта в клиническую практику. Для подтверждения безопасности использования искусственной кожи на основе К-ЭСК необходимо проведение расширенных доклинических испытаний на большем количестве экспериментальных животных, доказательство геномной стабильности и всесторонняя характеристика К-ЭСК. Тем не менее, данная работа — первое доказательство возможности получения чистых культур базальных кератиноцитов из ЭСК человека. Более того, это исследование является первым принципиально новым шагом в разработке разнообразных тканеинженерных эквивалентов кожи человека, история которых насчитывает уже более 20 лет [16].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Augustin M., Ermut T., Johnsen S. Effects of autologous keratinocyte transplantation on the quality of life of patients with severe chronic leg ulcers. *Dermatol. Psychosomat.* 2001; 2: 73–6.
2. Gallico G.G., O'Connor N.E., Compton C.C. et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311: 448–51.
3. Metcalfe A.D., Ferguson M.W. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials* 2007; 28: 5100–13.
4. Alsbjorn B. In search of an ideal skin substitute. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 1984; 18: 127–33.
5. Bongso A., Fong C-Y., Gauthaman K. Taking stem cells to the clinic: major challenges. *J. Cell. Biochem.* 2008; 105: 1352–60.
6. Knoepfler P.S. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* 2009; 27: 1050–6.
7. Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193–204.
8. Coraux C., Hilmi C., Rouleau M. et al. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Curr. Biol.* 2003; 13: 849–53.

9. Iuchi S., Dabelsteen S., Easley K. et al. Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cells. *PNAS* 2006; 103: 1792–97.
10. Green H., Easley K., Iuchi S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *PNAS* 2003; 100: 15625–30.
11. Aberdam D. Epidermal stem cell fate: what can we learn from embryonic stem cells? *Cell Tissue Res.* 2008; 331: 103–37.
12. Metallo C.M., Ji L., de Pablo J.J., Palecek S.P. Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 372–80.
13. Byrne C., Tainsky M., Fuchs E. Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 1994; 120: 2369–83.
14. Fuchs E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J. Cell. Sci. Suppl.* 1993; 17: 197–208.
15. Turksen K., Troy T.C. Epidermal cell lineage. *Biochem. Cell. Biol.* 1998; 76: 889–98.
16. Bell E., Sher S., Hull B. et al. The reconstitution of living skin. *J. Invest. Dermatol.* 1983; 81: 2s–10s.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Guenou H., Nissan X., Larcher F. et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *The Lancet* 2009; 374: 1745–53

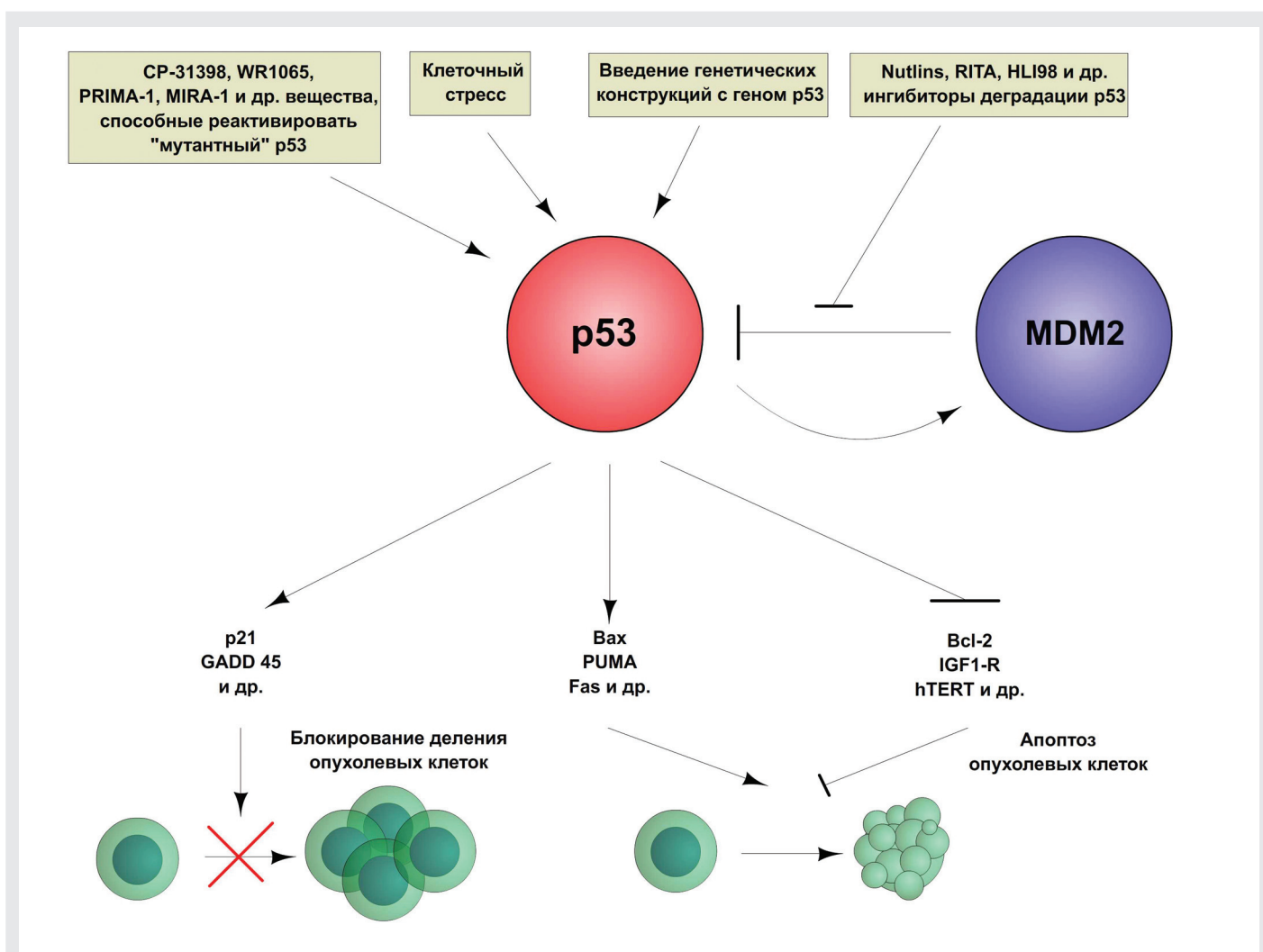
КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Результаты клинических испытаний препаратов INGN 201 и гендицина, несущих ген p53

Транскрипционный фактор p53 играет важную роль в процессах регуляции клеточного цикла, супрессии опухолей и предупреждении возникновения рака. p53 способен останавливать клеточный цикл на стадии G1-S посредством активации транскрипции гена белка p21(WAF1), который является ингибитором CDK2. Остановка клеточного цикла между G1-S фазами вызывается повреждениями ДНК, что дает возможность системам репарации восстановить нормальную структуру ДНК [1]. Если же повреждения не поддаются полной репарации, то p53 способен индуцировать апоптоз таких клеток через активацию проапоптического белка Araf-1 [2].

Неудивительно, что p53 представляет собой, пожалуй, наиболее распространенную мишень для генной терапии злокачественных новообразований [3]. Этот факт имеет под собой научную основу, поскольку мутации гена p53 встречаются приблизительно в половине случаев злокачественных новообразований [4]. В настоящий момент разработано большое количество препаратов для лечения злокачественных новообразований, которые должны заменять мутантную форму p53 на нормальную.

Одним из самых важных этапов разработки данного типа лекарственных средств являются клинические испытания, которым и посвящены описанные ниже две работы американских и китайских ученых.



Основные стратегии терапевтического воздействия на связанные с p53 сигнальные каскады для лечения злокачественных новообразований. По K. G. Wiman (2006)

В работе группы исследователей во главе с д-ром Ей Ли была осуществлена первая фаза клинических испытаний препарата гендицин (rAd-p53) [5], представляющего собой рекомбинантный аденовирус, несущий ген p53 дикого типа [6]. Препарат вводился интраэпителиально на протяжении двух недель 18 пациентам с лейкоплакией ротовой полости. Были отмечены некоторые побочные эффекты, такие как временная боль в месте инъекций и повышение температуры тела максимум до 38,9°C после введения препарата, примерно у трети пациентов на протяжении 12 часов после инъекции. У 15 из 18 пациентов был отмечен эпидермальный некроз и повышение экспрессии белка p53 в клетках эпителия ротовой полости. Полностью выздоровели четыре пациента (22,2% от общего числа), у которых было отмечено отсутствие рецидивов через полгода после окончания лечения. У девяти больных (50%) обнаружено уменьшение размеров зоны поражения, по сравнению с данным показателем до начала терапии гендицином. Только у двух больных, получавших инъекции гендицина, состояние осталось без изменений.

Таким образом, гендицин достаточно хорошо проявил себя при терапии лейкоплакии ротовой полости, что дает пациентам достаточные шансы на избежание оперативного вмешательства и выздоровление.

Практически в то же время, что и работа китайских исследователей, была опубликована еще одна статья, посвященная клиническим испытаниям препарата на основе гена p53. Под руководством проф. Грегори Уолфа (Кафедра отоларингологии Мичиганского университета) была проведена вторая фаза клинических исследований препарата INGN 201 (Ad5CMV-p53), состоящего из рекомбинантного аденовируса и гена p53 дикого типа [7]. Исследования были проведены на 13 пациентах с плоскоклеточной карциномой ротовой полости, глотки и горлани, отобранных за период с 2003 по 2006 г.

Препарат вводили дозами по $2,5 \pm 1,012$ вирусных частиц. Во время операции одну дозу вводили в паравульнарные ткани после удаления опухоли, следующую — сразу после операции в операционную рану на шее, и еще одна доза вводилась на 2–3 сутки после оперативного вмешательства через дренажные катетеры. Препарат не вводился в сосуды и нервы. Кроме введения INGN 201, пациенты получали химиотерапию цисплатином и радиотерапию.

Из 13 пациентов за период наблюдения 3 умерли, причем все от следствий рецидива карциномы. Таким образом, процент рецидивов при использовании INGN 201 составил приблизительно 23%, тогда как стандартный уровень данного показателя без применения генной терапии составляет 25–40% [8]. Следовательно, говорить о высокой эффективности INGN 201 по результатам данного исследования нельзя.

В то же время, авторы данной работы делают основной акцент на том, что им удалось провести клинические испытания препарата нового поколения без привлечения специализированных экспериментальных госпиталей, что в будущем может значительно ускорить процесс клинических испытаний. Авторы отмечают также очень низкий уровень вовлеченности пациентов (2–4% от общего числа) в клинические испытания, что связано, в первую очередь, с нежеланием рядовых врачей информировать больных о данных типах исследований.

Суммируя вышеописанные результаты, нужно отметить, что, несмотря на некоторую эффективность исследованных препаратов p53, остается проблема недостаточного количества пациентов при проведении клинических испытаний, что снижает достоверность исследований и значительно пролонгирует срок введения новых препаратов в клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Read A., Strachan T. Cancer Genetics. In: Human molecular genetics. 2nd ed. New York: Wiley; 1999. p. 427–44.
2. Lin L., Ye Y., Zakeri Z. p53, Apaf-1, caspase-3, and -9 are dispensable for Cdk5 activation during cell death. Cell Death and Differentiation 2006; 13: 141–50.
3. Zuckerman V., Wolyniec K., Sionov R.V., Haupt S., Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. J. Pathol. 2009; 219(1): 3–15.
4. Chomchai J.S., Du W., Sarkar F.H. et al. Prognostic significance of p53 gene mutations in laryngeal cancer. Laryngoscope 1999; 109(3): 455–9.
5. Zhang S., Li Y., Li L. et al. Phase I study of repeated intraepithelial delivery of adenoviral p53 in patients with dysplastic oral leukoplakia. J.

Oral Maxillofac. Surg. 2009; 67: 1074–82.

6. Han D.M., Swisher S.G., Roth J.A., Komaki R. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. Clin. Cancer Res. 2003; 9: 93.
7. Yoo G.H., Moon J., LeBlanc M. et al. Phase II trial of surgery with perioperative INGN 201 (Ad5CMV-p53) gene therapy followed by chemoradiotherapy for advanced, resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, hypopharynx, and larynx. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2009; 135(9): 869–74.
8. Vokes E.E., Weichselbaum R.R., Lippman S.M., Hong W.K. Head and neck cancer. N. Engl. J. Med. 1993; 328(3): 184–94.

Подготовил В.В. Стадник

По материалам: Zhang S., Li Y., Li L. et al. Phase I Study of Repeated Intraepithelial Delivery of Adenoviral p53 in Patients With Dysplastic Oral Leukoplakia. J. Oral Maxillofac. Surg. 2009; 67: 1074–82.

Yoo G.H., Moon J., LeBlanc M. et al. Phase 2 Trial of Surgery With Perioperative INGN 201 (Ad5CMV-p53) Gene Therapy Followed by Chemoradiotherapy for Advanced, Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity, Oropharynx, Hypopharynx, and Larynx. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2009; 135(9): 869–74

Адоптивная иммунотерапия лимфоцитами аллотрансплантата печени вызывает анти-HCV реакцию после пересадки печени у людей и гуманизированных мышей

История трансплантации печени (ТП) начинается в 1955 г., когда Chris Welch совершил первую успешную операцию на собаках [1]. В клинической медицине пионером в этой области выступил Thomas Starzl в 1963 г. [2]. Несмотря на то, что изначально выживаемость больных после ТП была очень низкой (в 70-е годы выживаемость в течение года составляла 25% [3]), ежегодно число выполненных операций значительно растет, и на начало XXI века проводилось около 8000 операций в год [4]. Помимо ежегодного прироста количественного показателя, значимые успехи достигнуты и в плане эффективности операции: выживаемость в течение первых пяти лет составляет более 80% [5], а в течение восемнадцати

лет — 48% [6]. Одной из значимых причин подобного улучшения является использование иммуносупрессивной терапии, которая в современном виде начинается как трехкомпонентная (циклоsporин А, преднизолон и один из следующих препаратов: азатиоприн, деклизумаб, мофетил микофенолат, базиликсимаб), с последующим переходом на двух- (циклоsporин А и преднизолон) или однокомпонентную схему (циклоsporин А) [3, 5, 7]. Иммуносупрессивная терапия резко уменьшила частоту отторжения трансплантата, но увеличила частоту рецидивов вирусного гепатита С (HVC) [8] и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [9], в то время как эти заболевания являются одними из наиболее частых причин ТП [10].

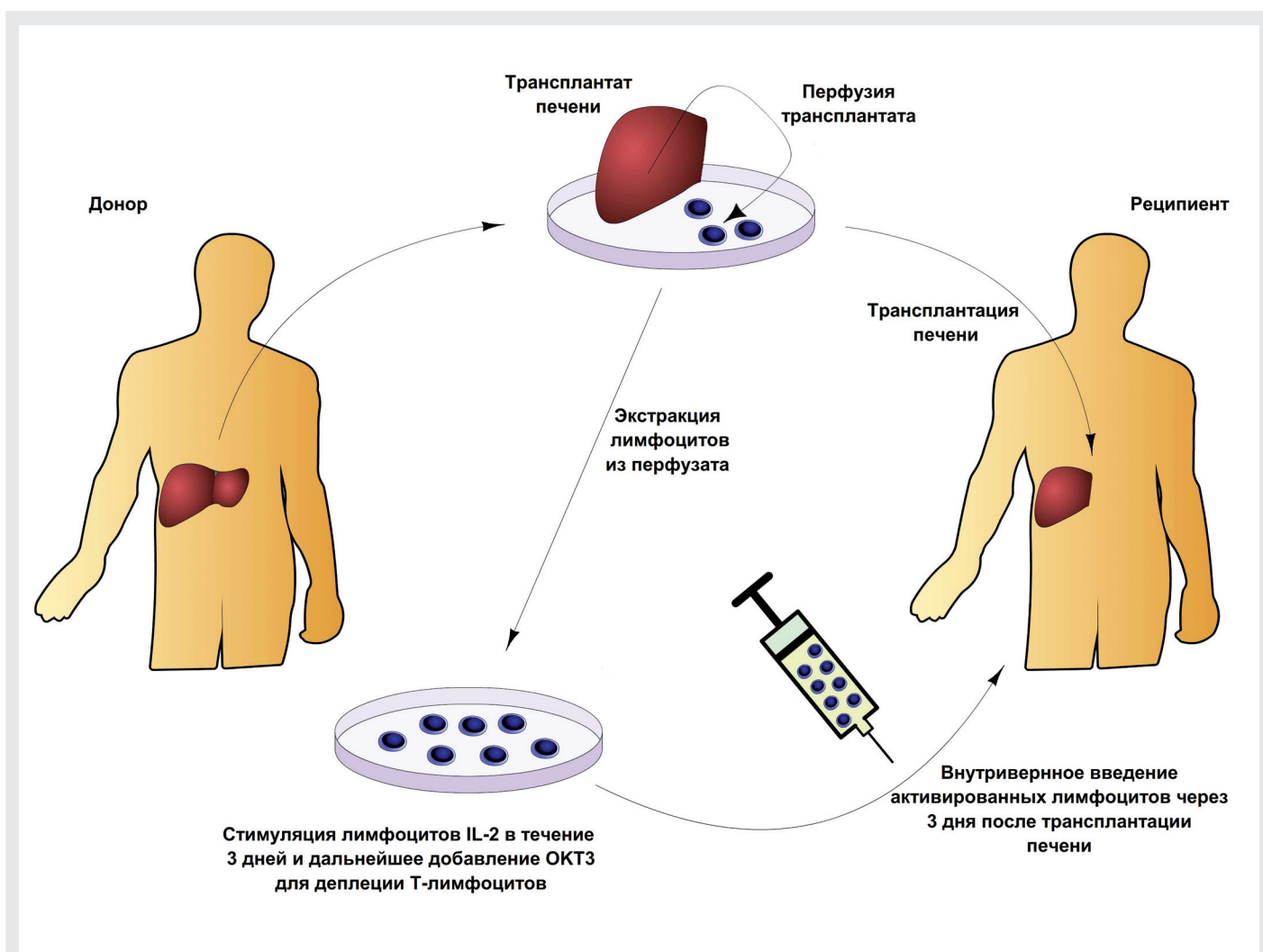


Схема адоптивной иммунотерапии

Таким образом, мы приходим к ситуации, когда нам нужно на фоне иммуносупрессорной терапии увеличить эффективность иммунного ответа против HCV и ГЦК.

В направлении пассивной иммунизации моноклональными антителами в наибольшей степени продвинулись исследователи Massachusetts Biologic Laboratories (University of Massachusetts Medical School), приступившие к первой фазе клинических испытаний терапевтического моноклонального антитела MBL-HCV1, показавшего высокую эффективность в исследованиях на шимпанзе [11]. В направлении, подразумевающим усиление клеточного иммунитета, значительный интерес представляет работа группы ученых из Tokyo Medical and Dental University под руководством профессора Hideki Ohdan, опубликованная в The Journal of Clinical Investigation.

В статье приводится комплексное исследование нового метода адоптивной иммунотерапии (АИТ), основанного на введении реципиентам ТП лимфоцитов, полученных при перфузии нормальной печени донора и культивируемых в среде, обработанной IL-2 и ОКТЗ (коммерческое название мышинных моноклональных антител против CD3 производства Orthoclone), проведенное на культуре гепатоцитов, на мышах, химеризированных гепатоцитами человека и, на заключительной стадии, в клинике Tokyo Medical and Dental University.

Стимулом к данной работе послужило, с одной стороны, нарастание титра RNA HCV в сыворотке ко второй неделе после трансплантации [12] и частые рецидивы HCV [8] и ГЦК [9], и, с другой стороны, большое количество и широкий спектр печеночных лимфоцитов (ПЛ) (в том числе и нетипичных для циркулирующих в крови по рецепторному аппарату, с преимущественно иммуносупрессивной функцией) [13] и большая цитотоксическая активность натуральных киллеров (NK) против ГЦК у ПЛ по сравнению с лимфоцитами крови [14].

В настоящей работе использовались ПЛ, полученные при портальной перфузии печени. Полученные таким образом клетки культивировались в течение 3 сут. в среде, содержащей 5% CO₂ при 37°C. В среду добавляли человеческий рекомбинантный IL-2 (Takeda) и ОКТЗ. ОКТЗ добавляли к культуре за 1 сут. до использования.

При кокультивировании ПЛ с гепатоцитами, реплицирующими HCV, были получены следующие результаты: ЛП, не культивировавшиеся с IL-2 и ОКТЗ, подавляли репликацию вируса в гепатоцитах, но в гораздо меньшей степени, чем ЛП, культивированные в среде, с добавлением IL-2 и ОКТЗ. При культивировании только с одним из компонентов эффективность противовирусного эффекта также снижалась относительно обработки обоими компонентами, при этом эффект от использования исключительно ОКТЗ был выше, чем эффект от использования исключительно IL-2. Также были описаны эффекты IL-2 и ОКТЗ на цитотоксичность различных лимфоцитарных фракций: при использовании одного IL-2 противовирусная активность CD56⁺ фракции была значимо выше, чем активность CD56⁻/CD3⁺ (Т-лимфоциты), при этом активность CD56⁺/CD3⁻ (NK) была эквивалентна активности CD56⁺/CD3⁺ (NKT). При использовании IL-2 и ОКТЗ заметно возрастала активность как CD56⁺, так и CD56⁻ фракции. Все группы лимфоцитов, индуцированных IL-2, активно синтезировали IFN γ . Введение блокирующих IFN γ антител снижало противовирусный эффект. Таким образом, можно сказать, что противовирусная активность ПЛ, культивируемых с IL-2 и ОКТЗ, хотя бы частично связана с IFN γ .

Следующим этапом была апробация АИТ на мышах, химеризированных гепатоцитами человека. Химеризи-

рованные мыши (ХМ) были получены по авторской методике, позволяющей практически полностью заменить мышинные гепатоциты человеческими. В данной методике использовались ранее известные линии мышей uPA (urokinase plasminogen activator, мыши, нокаутные по гену урокиназы, являющейся прямым активатором плазминогена) и SCID (severe combined immunodeficiency, мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом). Как было показано ранее, эти ХМ могут быть заражены HCV и служить моделью для оценки препаратов, направленных против HCV [15]. В настоящем исследовании ХМ заражались HCV путем введения 50 мл сыворотки больного человека. АИТ проводилась через 2 нед. после заражения. Введение рекомбинантного IFN γ также оказывало подавляющий эффект на развитие инфекции. Эффект АИТ, равно как и эффект рекомбинантного IFN γ , подавлялся при введении ХМ антител против IFN γ . При проведении АИТ или введении IFN γ спустя 4 нед. после заражения (к этому времени титр RNA HCV достигал уровня 10³/мл), профилактический эффект данных процедур не выявлялся. Во всех случаях, когда удавалось предотвратить развитие инфекции, в крови ХМ наблюдался постоянный уровень человеческого альбумина, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния АИТ и рекомбинантного IFN γ на человеческие гепатоциты.

После этого АИТ была проведена 14 больным, которым была проведена ТП по поводу ГЦК. 7 из 14 больных имели хронический HCV, у пятерых были положительные Миланские критерии (критерии для проведения трансплантации печени у больных с ГЦК). С целью профилактики рецидива ГЦК пациенты получали предлагаемую АИТ в виде однократной внутривенной инъекции в дозе 2–5×10⁸ клеток. Ни в одном случае не наблюдалось рецидивов ГЦК, в крови перенесших ТП в сочетании с АИТ отмечалось увеличение цитотоксических лимфоцитов, тропных к ГЦК клона HerG2. Также изменялось соотношение NK/NKT и возрастала доля NK, положительных по TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, зависимый от фактора некроза опухоли лиганд, индуцирующий апоптоз). Отмечалась статистически значимая корреляция между количеством TRAIL⁺ NK и цитотоксической активностью против ГЦК.

При оценке противовирусной активности данной АИТ авторы получили следующие результаты: у всех пациентов, как получавших, так и не получавших АИТ, отмечалось снижение титра РНК HCV в первый день после ТП и повышение к концу первой недели после операции до значений, превышающих исходный уровень. В то же время у двух пациентов, получавших АИТ, удалось полностью устранить виремию. При этом у одного из них удалось обнаружить вирусную РНК спустя 2 мес. после операции, а у другого не удалось обнаружить и спустя 20 мес. В то же время у двух пациентов, имевших наибольший титр РНК HCV до ТП, вообще не было ответа на АИТ. Спустя четыре недели после ТП, у 4 пациентов, получавших АИТ, содержание вирусной РНК в крови было ниже определяемого порога или отсутствовало вовсе, а у 3 определялось методом ПЦР. Уровень АЛТ в крови обеих групп был одинаков, что позволило предположить, что АИТ не препятствует репликации HCV, а поражает инфицированные гепатоциты.

Настоящая работа, бесспорно, представляет большой интерес как в теоретическом, так и в практическом смысле. Исследование, проведенное на культуре гепатоцитов и на химеризированных мышах, открывает новые грани механизмов иммунной защиты против гепатоцеллюлярной карциномы и вируса гепатита С и делает обосно-

ванными клинические испытания, представленные в данной работе. В то же время, в клинической части работы смущает маленькая выборка (всего 14 пациентов, из них только 7 инфицированы HCV). В связи с этим получаются практически равные группы в случае определения вирусной РНК через 4 нед. после трансплантации печени (4 пациента не имеют РНК HCV в достаточном для опре-

деления количестве, 3 имеют) и в случае оценки реакции на АИТ в отдаленной перспективе (2 пациента не отвечали на иммунотерапию, 3 отвечали умеренно и 2 не имели определяемого уровня РНК HCV в крови). Таким образом, работа смотрелась бы более целостно без раздела, посвященного клиническим испытаниям, которые, к тому же, в настоящий момент не завершены.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Welch C.S. A Note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant. Transplant Bull.* 1955; 2: 54.
2. Starzl T.E., Marchioro T.L., Vonkaulla K.N. et al. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1963; 117: 659–76.
3. Starzl T.E., Klintmalm G.B., Porter K.A., Iwatsuki S., Schroeter G.P. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N. Engl. J. Med.* 1981; 305(5): 266–9.
4. Ермолов А.С., Чжао А.В., Мусселиус С.Г. и др. Первый опыт трансплантации печени в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии* 2002; 1: 38–46.
5. Андрейцева О.И. Возможности ортотопической трансплантации печени при лечении больных с терминальными поражениями печени. *Consilium medicum* 2004; 06: 414–21.
6. Jain A., Reyes J., Kashyap R. et al. Long-term survival after liver transplantation in 4000 consecutive patients at a single center. *Ann. Surg.* 2000; 232: 490–500.
7. Borel J.F., Feurer C., Gubler H.U., Stahelin H. Biological effect of cyclosporine A: new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6: 468–75.
8. Brown R.S. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 2005; 436: 973–8.
9. Mazzaferro V., Regalia E., Doci R. et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 693–9.
10. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практическое руководство; пер. с англ. Под ред. Апросиной З.Г., Мухина Н.А. Москва: ГЭОТАР-МЕД; 2002.
11. First human gets new antibody aimed at hepatitis C virus Phase 1 clinical trial in healthy subjects designed to advance novel treatment to prevent. University of Massachusetts Medical School press release. August 6, 2009.
12. Garcia-Retortillo M., Forns X., Feliu A. et al. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680–7.
13. Doherty D. G., Norris S., Madrigal-Estebas L. et al. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3⁺CD56⁺ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J. Immunol.* 2002; 163: 2314–21.
14. Ishiyama K., Ohdan H., Ohira M. et al. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology* 2006; 43: 362–72.
15. Tateno C., Yoshizane Y., Saito N. et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.* 2004; 165: 901–12.

Подготовил М.А. Реутин

По материалам: Ohira M., Ishiyama K., Tanaka Y. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 3226–35

Экспансия НК лимфоцитов in vitro для использования в терапии пациентов с острыми лейкозами

Достижения клеточных технологий на сегодняшний день нашли свое клиническое применение главным образом в лечении пациентов со злокачественными гематологическими заболеваниями, где трансплантация красного костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) после протоколов химиотерапии и облучения является неотъемлемой частью терапии [1, 2]. Трансплантация HLA-совместимого клеточного материала зачастую неосуществима из-за отсутствия подходящих доноров, в связи с чем возникает проблема пожизненной иммуносупрессии для нивелирования реакции «трансплантат против хозяина», что ведет, в свою очередь, к возможности развития двух основных причин смерти пациентов: инфекционным осложнениям и рецидиву лейкоза [2]. Если профилактические мероприятия, направленные на снижение риска активации оппортунистических инфекций, многочисленны и разнообразны (ограничительные меры: диета, минимизация контактов с источниками инфекции; использование противомикробных препаратов, введение лимфоцитов в различных вариантах), то предупреждение рецидивов лейкозов является наиболее проблемным вопросом. Подтверждением этого является высокая частота рецидивов — от 20 до 60% в зависимости от вида лейкоза и стадии процесса [3].

Онкологическая настороженность в посттрансплантационном периоде побуждает к активному поиску и совершенствованию методов предупреждения рецидивов злокачественных гематологических заболеваний. Предложены протоколы профилактического использования химиопрепаратов, однако ни один из них не является оптимальным.

Одним из перспективных направлений является использование противоопухолевых потенциалов натуральных киллеров (НК-лимфоцитов), реализующихся без предшествующей сенситизации организма через идентификацию и устранение клеток-мишеней с измененной или отсутствующей экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости I, к которым относятся трансформированные клетки [4]. Теоретически, необходимый клеточный материал может быть получен непосредственно от донора или «наработан» in vivo из ГСК. Рядом авторов уже опубликованы положительные результаты экспериментов на мышиных моделях, отмечающие снижение частоты рецидивов лейкозов без увеличения риска развития реакции «трансплантат против хозяина» [5, 6], однако прецедентов клинических исследований с применением культивированных in vitro НК-лимфоцитов для предупреждения рецидивов лейкозов до настоящего времени не было.

В этой связи представляют интерес результаты работы S.R. Yoon и соавт., впервые определяющей возможность экспансии НК-лимфоцитов в условиях *in vitro* из CD34⁺ предшественников с целью дальнейшего использования для достижения устойчивой ремиссии лейкозов у пациентов, перенесших трансплантацию HLA-несовместимых ГСК.

Для работы были отобраны 18 пациентов (16 с острым лейкозом и 2 с миелодиспластическим синдромом), для которых оказалось невозможным найти HLA-совместимых доноров, однако по ряду причин (смерть одного пациента из-за быстрой прогрессии заболевания, сложности в процессе получения культуры НК-лимфоцитов *in vitro*) четыре пациента не приняли участие в исследовании. Всем пациентам (возраст от 23 до 65 лет) была выполнена трансплантация ГСК с осуществлением в предоперационном периоде протоколов химиотерапии, рассчитанных специально для случаев введения HLA-несовместимого клеточного материала. В раннем посттрансплантационном периоде пациентам для профилактики реакции «трансплантат против хозяина» назначались циклоспорин и короткий курс метотрексата.

Получение НК-лимфоцитов осуществлялось из CD34⁺ предшественников, выделенных из крови доноров и культивированных первые три недели в среде, содержащей фактор стволовых клеток человека (human stem cell factor), лиганд fms-связанной тирозинкиназы-3 человека (human fms-related tyrosine kinase 3 ligand), человеческий интерлейкин-7 и гидрокортизон, а в последующие 21 сут. в среде с человеческими интерлейкинами-15 и 21 и гидрокортизоном. Иммунофенотипическое обоснование принадлежности полученной культуры к НК-лимфоцитам выполнялось на основе определения основных маркеров — CD122, CD56, KIR (иммуноглобулиноподобный рецептор киллеров (killer immunoglobulin-like receptor)) в сочетании с отрицательной экспрессией CD3. Кроме того, авторы доказали цитотоксичность культуры НК-лимфоцитов в опыте с коинкубированием их с трансформированными клетками линии K562, мечеными радиоизотопом хрома (Cr51). Также была установлена экспрессия генов перфорина и гранзима, характерных для НК-лимфоцитов.

Введение клеточной культуры осуществлялось при отсутствии острой реакции «трансплантат против хозяина», активных инфекционных процессов, нарушений функции печени, почек и сердца между 43 и 50 сут. после

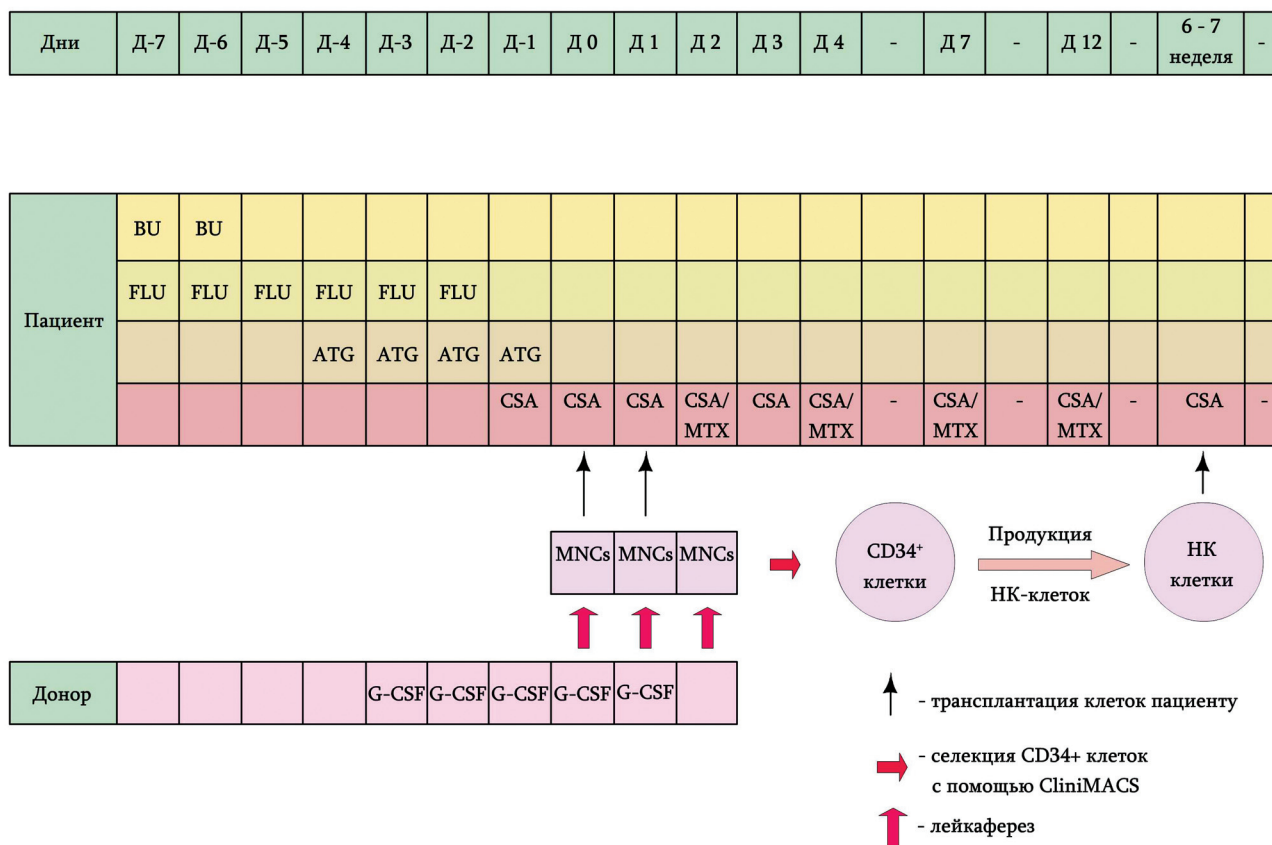


Схема протокола лечения больных с онкогематологическими заболеваниями, использованного в исследовании:
 BU – бусульфан; FLU – флюдарбин; ATG – антитимоцитарный иммуноглобулин; CSA – циклоспорин; MTX – метотрексат;
 MNCs – мононуклеарная фракция клеток крови; G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

трансплантации ГСК в 5% растворе альбумина, и не вызывало острых побочных эффектов в виде лихорадки, головной боли, тошноты, рвоты, гипотензии. В двух случаях исследователи были вынуждены вводить НК-лимфоциты пациентам с рецидивом острого лейкоза, остальным — в фазе ремиссии.

Средняя выживаемость после трансплантации ГСК составила 18,7 мес. У одного пациента развилась острая (на седьмой день после введения НК-лимфоцитов), у четырех — хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (в среднем между 14 и 68 днем после инфузии НК-лимфоцитов), однако авторы отмечают невозможность установления однозначной причины — введение ГСК или НК-лимфоцитов от HLA-несовместимых доноров. Важно, что в двух случаях, когда исследователи были вынуждены трансплантировать НК-лимфоциты в активной стадии лейкоза, антиопухолевого эффекта не наблюдалось, что, возможно, связано со значительным преобладанием трансформированных клеток по отношению к введенным.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Carella M.A., Lerma E., Dejana A. Engraftment of HLA-matched sibling hematopoietic stem cells after immunosuppressive conditioning regimen in patients with hematologic neoplasias. *Haematologica* 1998; 83: 904–9.
2. Ljungman P., Urbano-Ispizua A., Cavazzana-Calvo M. et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37: 439–49.
3. Kumar L. Leukemia: management of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.* 1994; 12(8): 1710–7.

Авторы в своей работе не указали причины смерти пациентов, тем самым оставив без оценки эффективность введения НК-лимфоцитов для предупреждения рецидивов лейкозов, что, на первый взгляд, было бы вполне реализуемо в условиях данного клинического исследования. Основной акцент был сделан на доказательстве выполнимости экспансии НК-лимфоцитов *in vitro* из CD34⁺ предшественников и возможности их дальнейшего использования в терапии пациентов, перенесших трансплантацию HLA-несовместимых ГСК, без индукции острой реакции «трансплантат против хозяина». Положительные результаты работы позволили авторам сформулировать направления дальнейших исследований, касающихся определения максимально возможной «дозы» НК-лимфоцитов, которую можно трансплантировать в организм реципиентов без серьезных побочных эффектов, а также определения эффективности их применения для предупреждения рецидивов лейкозов.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Yoon S.R., Lee Y.S., Yang S.H. et al. Generation of donor natural killer cells from CD34⁺ progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation: a feasibility study. *Bone Marrow Transplant.* Published online 2 November 2009

Успешное применение генной терапии для лечения X-сцепленной формы адренолейкодистрофии

Наследственная X-сцепленная форма адренолейкодистрофии (АЛД) представляет собой фатальное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС), причиной которого являются мутации в гене ABCD1, кодирующем белок-транспортер ALDP, локализованный в мембранах пероксисом [1]. В пероксисомах олигодендроцитов и клеток микроглии этот белок участвует в транспорте эфиров длинноцепочечных жирных кислот (ДЦЖК; более 22 атомов углерода в алифатическом «хвосте»), что необходимо для миелинизации нервных волокон [2]. В результате мутации развивается мультифокальный демиелинизирующий процесс, который приводит к гибели больного, как правило, еще в подростковом возрасте.

Единственным способом излечить это врожденное заболевание является аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток. Успех подобной терапии может быть достигнут только на ранних стадиях болезни и при наличии подходящего донора [3]. Поскольку микроглиальные клетки имеют миелоидное происхождение, полагают, что замещение мутантных гемопоэтических

стволовых клеток и клеток-предшественников реципиента «здоровыми» клетками донора позволяет в итоге восстановить процесс миелинизации нервных волокон в ЦНС. Действительно, было показано, что костномозговые клетки человека, трансплантированные мышам, мигрируют в головной мозг и дифференцируются в микроглиальные клетки, экспрессирующие ALDP [4].

Долгосрочные результаты клинического испытания по применению трансплантации генетически «исправленных» аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), проведенной двум пациентам с АЛД, были опубликованы в журнале «Science». Несомненно, эта работа стала кульминацией продолжительных исследований д-ра Натали Картье (Nathalie Cartier; INSERM) и проф. педиатрии Патрика Эбера (Patrick Aubourg; INSERM и госпиталь Сент-Винсент де Поля) [5]. У обоих пациентов (возраст 7,5 и 7 лет) были обнаружены мутации в гене ABCD1. Несмотря на прогрессирующую демиелинизацию и недостаточность функции надпочечников, отсутствие совместимого донора не давало возможности провести аллогенную трансплантацию.

После процедуры G-CSF-индуцированной мобилизации $CD34^+$ клетки были выделены с помощью иммуномагнитной сепарации. Для генетической коррекции клеток пациентов использовали лентивирусный вектор на основе ВИЧ-1, содержащий интактную копию гена ABCD1. В результате трансдукции 50% и 33% трансплантированных $CD34^+$ клеток экспрессировали функционально активный белок ALDP, что привело к более чем двукратному (55% и 68%) снижению в этих клетках уровня ДЦЖК. Инфузию модифицированных $CD34^+$ клеток проводили после процедуры полной миелоабляции (циклофосфамид и бисульфат), что важно для успешного приживления трансплантата, поскольку лентивирусная коррекция не дает трансплантированным клеткам пролиферативного преимущества по сравнению с остаточными, мутантными ГСК. Восстановление гемопоэза у пациентов наступило соответственно на 13-е и 15-е сут.

Посттрансплантационный анализ показал, что со временем экспрессия ALDP в мононуклеарных клетках периферической крови постепенно снижается, стабилизируясь на уровне 10% и 15% спустя 30 и 24 мес. после трансплантации (соответственно для 1-го и 2-го пациентов). Разные популяции клеток крови экспрессировали примерно одинаковое количество ALDP (9–14%),

уровень экспрессии ALDP в $CD34^+$ клетках был выше, около 18%.

Поскольку места геномной интеграции вектора представляют собой высоко специфичный маркер для анализа отдельных клеточных клонов, авторы работы провели детальное исследование репертуара инсерционных сайтов (ИС) с помощью амплификации уникальных геномных последовательностей, фланкирующих интегрированный вектор (LAM-PCR – полимеразная цепная реакция, опосредованная линейной амплификацией) [6], и последующего секвенирования полученного ампликона. Было обнаружено 2217 и 1380 уникальных ИС, большая доля которых располагалась в областях, богатых генами. Этот подход позволил выявить 1,4% и 4,6% ИС, присутствующих как в лимфоидных, так и в миелоидных клетках. Это означает, что вектор был интегрирован в истинные ГСК, способные давать начало клеткам обеих ветвей гемопоэза. Кроме того, количественный анализ ИС показал, что клональный репертуар распределен равномерно: не было обнаружено таких ИС, интеграция вектора в которые приводила бы к активной пролиферации клона и клональному доминированию.

Спустя 14–16 мес. после трансплантации у пациентов прекратилась прогрессирующая демиелинизация

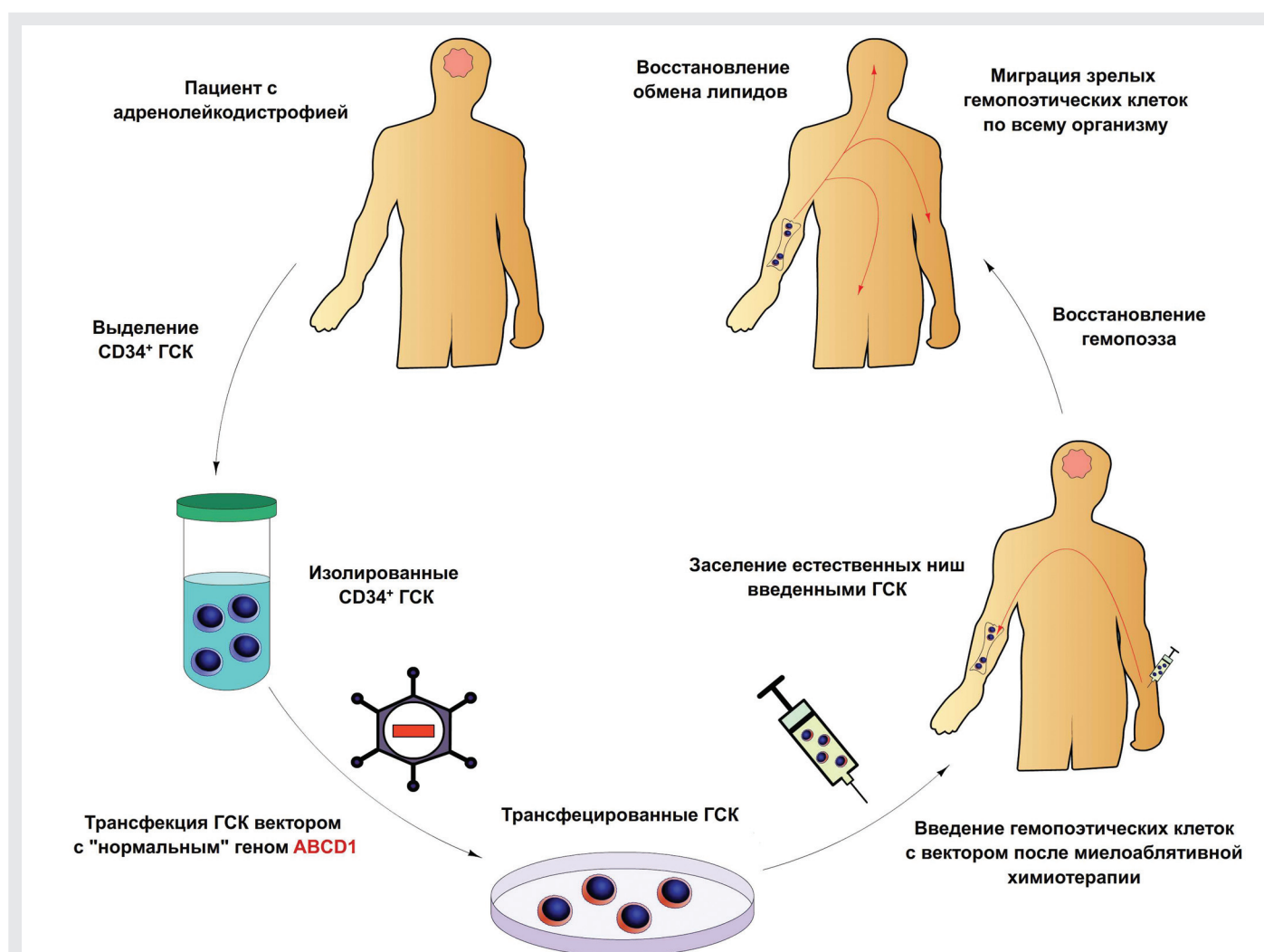


Схема генной терапии X-сцепленной формы аденолейкодистрофии

пирамидального тракта, фронтального белого вещества и других пораженных зон головного мозга. Это сопровождалось стабилизацией нейробиологических и когнитивных функций и снижением уровня ДЦЖК в плазме на 38–39%. Важно отметить, что коррекция уровня ДЦЖК оказалась значительно больше ожидаемой, поскольку функционально полноценный ALDP экспрессировало лишь 14% моноцитов.

Успешные результаты этого клинического испытания во многом обусловлены верным выбором вектора для генетической коррекции CD34⁺ клеток. Сокращенный протокол для трансдукции и стабильная экспрессия транскрипта несмотря на отсутствие клонального доминирования у трансдуцированных клеток — несомненно, важные преимущества использованного лентивирусного вектора на основе ВИЧ-1. Кроме того, данный вектор содержит инактивирующийся промотор/энхансер длинных терминальных повторов (LTR), что предотвращает генотоксические эффекты, обусловленные транскрипционно активными LTR [7], а, значит, снижает вероятность онкотрансформации модифицированных клеток.

Главным и неожиданным выводом из этой работы явилось то, что стабильная экспрессия ALDP лишь в примерно 15% CD14⁺ моноцитов достаточна для купирования демиелинизирующего процесса и нейробиологических нарушений у пациентов.

Это кардинально отличается от результатов аллогенной трансплантации ГСК у больных АЛД, где блокада прогрессирующей демиелинизации в головном мозге наблюдалась только при более чем 80% приживлении донорских кроветворных клеток [3]. Авторы полагают, что такая разница может быть обусловлена выраженной экспрессией белка ALDP в генетически модифицированных микроглиальных клетках, что позволяет купировать демиелинизацию нервной ткани.

После длительного периода неудач и скептицизма прошедший год можно, несомненно, обозначить как год возвращения генной терапии в ряды перспективных подходов для лечения наследственных заболеваний [8]. Этот факт был однозначно подчеркнут журналом Science при традиционном ежегодном отборе наиболее значимых событий в сфере науки [9]. Так, успешные долгосрочные результаты также были получены при лечении аутосомно-рецессивной формы тяжелого комбинированного иммунодефицита (дефицит аденозиндезаминазы) [10] и амавроза Лебера (врожденная дистрофия сетчатки глаза) [11]. Клинические испытания с привлечением большего числа пациентов должны в дальнейшем определить судьбу генной терапии этих наследственных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Aubourg P., Mandel J.L. X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996; 804: 461–76.
2. Aubourg P., Dubois-Dalcq M. X-linked adrenoleukodystrophy enigma: how does the ALD peroxisomal transporter mutation affect CNS glia? *Glia* 2000; 29(2): 186–90.
3. Shapiro E., Krivit W., Lockman L. et al. Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet* 2000; 356(9231): 713–8.
4. Asheuer M., Pflumio F., Benhamida S. et al. Human CD34⁺ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein. *PNAS* 2004; 101(10): 3557–62.
5. Successful treatment of adrenoleukodystrophy by transplantation of stem cells carrying a new gene therapy vector. INSERM, press information, Friday 06 November 2009. www.inserm.fr/content/download/5367/43422/file/cp_adrenoleukodystrophie_06nov09 (version anglaise).pdf

6. Schmidt M., Schwarzwaelder K., Bartholomae C. et al. High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nat. Methods* 2007; 4(12): 1051–7.

7. Montini E., Cesana D., Schmidt M. et al. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(4): 964–75.

8. Naldini L. Medicine. A comeback for gene therapy. *Science* 2009; 326(5954): 805–6.

9. Breakthrough of the year. The runners-up. *Science* 2009; 326(5960): 1600–7.

10. Aiuti A., Cattaneo F., Galimberti S. et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(5): 447–58.

11. Maguire A., High K., Auricchio A. et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009; 374(9701): 1597–605.

Подготовил А.В. Лелявский

По материалам: Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C.C. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009; 326 (5954): 818–23