

НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Показана возможность лечения анемии Фанкони путём генетической коррекции iPS клеток

Возможность перепрограммирования соматических клеток взрослых для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [1] (iPS-клеток) открыла дорогу совершенно новым методам экспериментального моделирования человеческих заболеваний.

iPS-клетки, специфичные пациенту, могут стать основой нового метода лечения анемии Фанкони (АФ), генетического заболевания, при котором наблюдается

несколько гематологических аномалий, ослабляющих способность к борьбе с инфекциями, ухудшающих доставку кислорода и свертываемость крови [2]. Частота возникновения АФ в Европе и США составляет 3 на 1 млн населения [2]. Существует 13 генов (один из них сцеплен с половой X хромосомой), мутации в которых могут стать причиной АФ [3]. Все эти гены относятся к одному метаболическому пути. У пациентов с АФ кроме

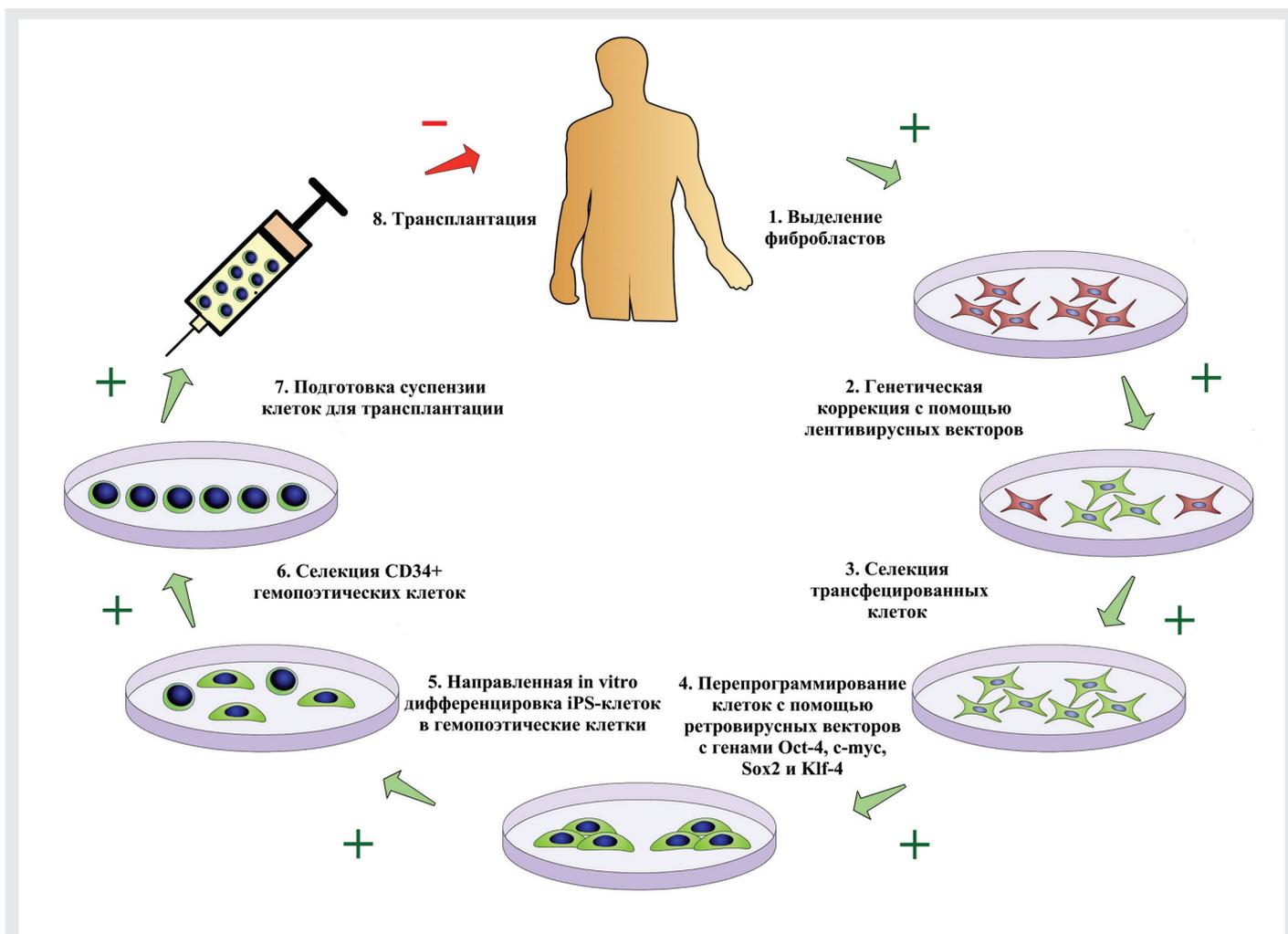


Схема коррекции анемии Фанкони с помощью генетической модификации iPS-клеток. В исследовании были выполнены все этапы (за исключением трансплантации), необходимые для лечения анемии Фанкони с помощью генетической коррекции iPS-клеток. Фактически, в настоящее время началу клинических испытаний препятствует лишь отсутствие эффективных методов получения iPS-клеток без использования генетических конструкций

нарушения гемопоэза также проявляется высокая предрасположенность к опухолеобразованию. В настоящий момент анемию Фанкони лечат пересадкой костного мозга от здоровых братьев или сестер пациента, полностью или частично идентичных по антигенам главного комплекса гистосовместимости. Однако и в этом случае остаётся высокая вероятность отторжения и других осложнений.

В связи с тем, что недостаточность костного мозга у пациентов с АФ проявляется в результате существенного снижения числа функциональных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), то генетическую коррекцию рационально проводить не на самих ГСК, а на iPS-клетках, что и было продемонстрировано в совместной работе испанских учёных. Они показали возможность получения iPS-клеток пациентов с АФ и произвели их дальнейшую генетическую коррекцию. Такой подход позволит производить большое количество аутогенных, генетически стабильных гемопоэтических клеток, которые можно будет использовать в лечении, без опасности отторжений.

Генетическая коррекция заключалась во введении лентивирусного вектора, как наиболее устойчивого к подавлению экспрессии в человеческих клетках [4], кодирующего исправленные белки метаболического пути АФ — FANCA или FANCD2. Перепрограммирование соматических клеток исследователи осуществляли путём инфицирования полученных кожных фибробластов от пациентов с АФ ретровирусом, кодирующим меченые с N-конца белки OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, сразу после генетической коррекции мутаций. Затем клетки высаживались на фидерный слой человеческих фибробластов, где в случае успешного перепрограммирования превращались в iPS-клетки и формировали колонии. Иммунофлуоресцентным анализом было показано, что полученные клетки экспрессировали транскрипционные факторы и поверхностные маркеры, специфичные для плюрипотентных клеток, что подтверждает успешное перепрограммирование.

При дальнейшей характеристике iPS-клеток было подтверждено присутствие в них перепрограммирующих трансгенов, однако уровень их экспрессии оказался низким, что показал метод количественной ПЦР. Более того, была показана реактивация экспрессии собственных

белков OCT4 и c-MYC, а также других транскрипционных факторов, ассоциированных с плюрипотентностью. Это говорит о том, что присутствие экзогенных перепрограммирующих агентов необходимо лишь на начальной стадии.

В условиях *in vitro* полученные iPS-клетки были способны дифференцироваться в эктодермальные, мезодермальные и энтодермальные производные, о чём можно судить по клеточной морфологии, а также по иммунофлуоресцентному окрашиванию против α -фетопротейна/FOXA2, TuJ1/GFAP и α -актина, соответственно.

Функциональная активность метаболического пути АФ в полученных клетках проверялась следующим образом. С помощью высокоэнергетического ультрафиолетового воздействия в клетках индуцировалось накопление заблокированных репликационных вилок, куда в норме перемещается белок FANCD2 [5]. Такой эффект наблюдался у генетически скорректированных клеток, что говорит о полном восстановлении АФ пути, т.е. излечения на клеточном уровне.

Исследователями была показана способность полученных iPS-клеток дифференцироваться в гемопоэтические клетки. В культурах были определены CD34⁺ и CD45⁺ клетки. Очищенные CD34⁺ клетки, полученные из генетически скорректированных iPS-клеток пациентов с АФ, формировали обширные эритроидные и миелоидные колонии, сравнимые с контролем. Кроме того, было подтверждено, что АФ путь в таких клетках полностью восстановлен.

В данной работе впервые была показана принципиальная возможность лечения человеческих генетических заболеваний путём комбинации генной терапии и технологии iPS-клеток. Однако до того как новый метод будет применен в клинике, нужно решить еще большое количество проблем. Несмотря на то, что в процессе перепрограммирования уменьшается экспрессия введённых трансгенов, остаётся опасность их реактивации при дифференцировке, что может приводить к образованию опухолей. Кроме того, существует опасность инфицирования при использовании вирусных векторов для доставки трансгенов. Ясно одно, необходимо разрабатывать технологии перепрограммирования без введения чужеродных генов [6].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–72.
2. Tischkowitz M. D., Hodgson S.V. Fanconi anaemia. *J. Med. Genet.* 2003; 40: 1–10.
3. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature Rev. Genet.* 2007; 8: 735–48.

4. Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y., Verma I. M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *PNAS* 2002; 99: 2140–5.

5. Bogliolo M., Lyakhovich A., Callen E. et al. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J.* 2007; 26: 1340–51.

6. Zhou H., Wu S., Joo J.Y. et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 381–4.

Подготовила П.Ю. Новикова

По материалам: Raya A., Rodríguez-Piza I., Guenechea G. et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460: 53–9

Роль клеток Клара в поддержании постоянства и репарации повреждений эпителия дыхательных путей

Исследования стволовых клеток (СК) и прогениторных клеток эпителия дыхательных путей млекопитающих характеризуются определенной спецификой: слишком часто экспериментальные результаты не дают ясного ответа на поставленные вопросы. В этом плане показательна работа коллектива авторов из Duke University, опубликованная в июньском номере Cell Stem Cell [1]. Исследование посвящено степени участия в постнатальном росте, поддержании гомеостаза и репарации повреждений эпителия легких мыши нереснитчатых бронхиальных клеток, называемых клетками Клара. Известно, что после окончания постнатального роста ткань эпителия легких переходит в стационарное состояние с очень низкой скоростью обновления клеток. Повреждение же эпителия стимулирует его быстрое восстановление и обновление. Попытки выявить резидентные соматические СК или прогениторные клетки эпителия легких до сих пор приводили к получению неоднозначных результатов.

Понятнее всего обстоят дела с эпителием альвеол — в нем основными прогениторными клетками являются альвеолоциты 2-го типа (АЦ2) [2]. В эпителии бронхиол, содержащем реснитчатые, нереснитчатые (клетки Клара) и нейроэндокринные клетки, именно клетки Клара рассматриваются многими современными исследователями в качестве основного кандидата на роль резидентных стволовых или прогениторных клеток [3–5]. При этом было продемонстрировано, что необходимым и достаточным для восстановления эпителия бронхиол было выживание лишь определенных субпопуляций клеток Клара [6, 7]. Кроме того, в «бронхоальвеолярных сочленениях» (БАС) была обнаружена специфическая популяция клеток, одновременно несущих маркеры клеток Клара (секретоглобулин-1a1 — Scgb1a1) и АЦ2 (белок С сурфактанта — SftpC или SpC), которые было предложено считать бронхоальвеолярными СК (БАСК) [8]. Наконец, в трахеальном эпителии роль СК обычно выполняют т.н. базальные клетки [9, 10], однако при селективном повреждении реснитчатых клеток в трахее происходит индукция деления клеток Клара, а не базальных эпителиоцитов [11].

Вопросы, на которые своими экспериментами попытались ответить авторы обсуждаемой статьи [1], были сформулированы следующим образом: только ли те субпопуляции клеток Клара, которые ведут себя как СК, вовлечены в развитие или репарацию слизистой оболочки дыхательных путей, или в этом участвует вся популяция нереснитчатых клеток? Не являются ли клетки Клара факультативными прогениторами, активирующимися только в ответ на повреждение эпителия? Можно ли считать, что в эпителии трахеи присутствуют две различных популяции СК (базальные и клетки Клара), или базальные клетки являются СК, а вторые — способны лишь к транзиторной пролиферации?

Для поиска ответов авторы получили особую генетически модифицированную линию мышей, у которых ген, кодирующий химерный белок (рецептор эстрогенов, модифицированный рекомбиназой Cre — CreER), был внедрен в локус Scgb1a1. Cre, являющаяся особым типом

топоизомеразы I, обеспечивает рекомбинацию сегментов ДНК, фланкированных loxP (floxed segments), в клетках, экспрессирующих Cre [12]. При использовании химерного белка CreER экспрессия Cre и, соответственно, сама рекомбинация индуцируется введением тамоксифена [13]. Это позволило получить «knockin»-мышей с меткой, позволяющей проследить наличие и судьбу клеток Клара и предполагаемых БАСК на различных стадиях развития животных. В ходе исследования авторы показали, что эффективность и специфичность lineage-мечения зависит от дозы введенного тамоксифена. Количество меченых клеток в разных участках варьировало, но всегда их было больше всего в терминальных бронхиолах, несколько меньше в проксимальных бронхиолах и меньше всего в трахеях. В отсутствие тамоксифена (контроль) рекомбинация была выявлена лишь в 5% клеток Клара в бронхиолах, а клетки Клара в трахеях, БАСК и АЦ2 не метились. Введение тамоксифена приводило к эффективному lineage-мечению клеток Клара и предполагаемых БАСК: четыре последовательных введения тамоксифена (по 0,25 мг/г массы, через день) позволяли пометить 80% бронхиальных клеток Клара и более 90% БАСК. Однако одновременная экспрессия Scgb1a1 (маркер клеток Клара) и SftpC (маркер АЦ2) наблюдается не только в предполагаемых БАСК, но и в небольшой части (8%) АЦ2.

Очень важно отметить, что lineage-метка не обнаруживалась в легких новорожденных мышей, если инъекция тамоксифена выполнялась пренатально беременным мышам ранее, чем на 15-е сут. развития эмбриона. Это значит, что в онтогенезе клетки Клара дифференцируются лишь в последней трети периода эмбрионального развития. Отметим, что несколькими годами раньше другие исследователи обнаружили, что в культуре мышинных эмбриональных СК, клетки Клара также появляются именно на 15-е сут. развития [14].

В постнатальном развитии в бронхиолах процентное содержание lineage-меченых клеток (клетки Клара + БАСК) и скорость самообновления популяции клеток Клара сохранялись постоянными в течение 1-го года жизни животных (дольше эксперимент не проводился). При этом в бронхиолах клетки Клара могут дифференцироваться в реснитчатые (но не нейроэндокринные или какие-либо иные) клетки. Скорость замещения реснитчатых клеток новыми клетками, образующимися из клеток Клара, составила 0,9% за неделю. В условиях повреждения эпителия бронхиол активация этих клеток обеспечивает восстановление эпителия.

В отличие от бронхиол, в трахее функции клеток Клара, видимо, иные. В трахее с возрастом происходило уменьшение количества этих клеток (рис. Б). Самообновление популяции этих клеток не было выявлено, хотя часть новых реснитчатых клеток происходила из клеток Клара. Их значимая прогениторная роль в эпителии трахеи была показана только в ситуации, связанной с репарацией эпителия после воздействия SO_2 . В альвеолах клетки Клара не обнаруживались, а БАСК были неспособны к самообновлению или к порождению других типов клеток.

Перечисленные наблюдения позволили авторам статьи [1] заключить:

Клетки Клара играют роль прогениторных клеток в эпителии бронхиол и трахеи мышей. Появление и их активация у плода наблюдается только в последней трети периода эмбрионального развития.

Клетки Клара в бронхиолах способны к самообновлению собственной популяции и к порождению реснитчатых клеток, а в трахее — только к порождению реснитчатых клеток, но не к самообновлению.

Повреждение эпителия, как в бронхиолах, так и в трахее приводит к активации пролиферации клеток Клара, необходимой для репарации эпителия.

Клетки Клара и БАСК не проявляют прогениторных свойств в альвеолярном эпителии.

Не получено доказательств, что БАСК являются функционально особой популяцией клеток эпителия легких.

Однако нельзя обойти вниманием тот факт, что, несмотря на общее весьма значительное число включенных в исследование животных, в каждом эксперименте на одну временную точку приходилось от 2 до 5 живот-

ных. Кроме того, авторы приводят лишь количество проанализированных микроскопических изображений из каждого опыта и анатомического региона, но не указывают суммарное число проанализированных клеток, т.е. пропорции содержания клеток определяются из сходных проанализированных площадей эпителия, но не из сходного числа клеток. Обе эти особенности планирования экспериментов в принципе могут служить источником повышения вероятности систематического сдвига в анализе полученных результатов. Правда, скорее всего, эти возможные смещения не настолько велики, чтобы поставить под сомнение качественные выводы, сделанные авторами обсуждаемой статьи [1]. Главным результатом обсуждаемой статьи, по мнению редакции Science Daily [15], является прямое доказательство факта, что для поддержания стабильности состава и для восстановления повреждений легочного эпителия требуются различные типы резидентных стволовых/прогениторных клеток. Этот факт имеет большое значение для исследований патологического ремоделирования легочного эпителия и для работ в области регенеративной медицины.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rawlins E.L., Okubo T., Xue Y. et al. The role of Scgb1a1⁺ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 525–34.
2. Evans M.J., Cabral L.J., Stephens R.J., Freeman G. Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp. Mol. Pathol.* 1975; 22: 142–50.
3. Reynolds S.D., Hong K.U., Giangreco A. et al. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 278(6): L1256–63.
4. Have-Opbroek A.A.W., Randell S.H., Stripp B.R. Stem cells in lung morphogenesis, regeneration, and carcinogenesis. In Sell S. editor. *Stem Cell Handbook*. Humana Press; 2004: 455–72.
5. Emura M. Stem cells of the respiratory tract. *Paediatric Resp. Rev.* 2002; 3(1): 36–40.
6. Hong K.U., Reynolds S.D., Giangreco A., Hurley C.M., Stripp B.R. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001; 24(6): 671–81.
7. Giangreco A., Reynolds S.D., Stripp B.R. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am. J. Pathol.* 2002; 161(1): 173–82.

8. Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E. et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823–35.

9. Hong K.U., Reynolds S.D., Watkins S., Fuchs E., Stripp B.R. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004; 286(4): L643–9.

10. Rock J.R., Onaitis M.W., Rawlins E.L. et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *PNAS* 2009; 31(106): 12771–5.

11. Evans M.J., Shami S.G., Cabral-Anderson L.J., Dekker N.P. Role of nonciliated cells in renewal of the bronchial epithelium of rats exposed to NO₂. *Am. J. Pathol.* 1986; 123(1): 126–33.

12. Akagi K., Sandig V., Vooijs M. et al. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucl. Acids Res.* 1997; 25(9): 1766–73.

13. Hayashi S., McMahon A.P. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Biol.* 2002; 244(2): 305–18.

14. Coraux C., Nawrocki-Raby B., Hinnrasky J. et al. Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 2005; 32(2): 87–92.

15. Sleuths follow lung stem cells for generations to shed light on healing. *ScienceDaily* <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/06/090604144336.htm>.

Подготовил В.Г. Зайцев

По материалам: Rawlins E.L., Okubo T., Xue Y. et al. *The role of Scgb1a1⁺ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 525–34

Межклеточная передача эндосомального сигнала в гемопоэтических нишах костного мозга *ex vivo* на примере нормальных гемопоэтических клеток и гемобластозных клеток клона KG1a

В 1978 году R. Scolfield предложил концепцию, согласно которой кроветворные клетки развиваются в постоянном взаимодействии с мезенхимальными (стромальными) клетками и остеобластами [1]. Эта теория получила название теории костномозговых ниш. В современной науке эта теория получила должное признание и развитие, а также была принята на вооружение исследователями других групп стволовых клеток (СК). Описано взаимодействие между гемопоэтическими и стромальными клетками, нейральными СК и астроцитами, описано влияние мезенхимальных (стромальных) СК на клетки лимфоидного ряда. Существуют даже теории, рассматривающие лейкозы различной клеточной природы как нарушение функции стромального микроокружения [2, 3]. В то же время остаются неизученными многие механизмы межклеточного взаимодействия в костномозговой нише (КН), или, шире, в нише стволовых клеток. В последнее время работы, посвященные вопросам коммуникации между стволовыми и стромальными клетками, занимают значимое место среди публикаций по клеточной биологии. Были открыты многие вещества, участвующие в этом взаимодействии: тромбopoэтин, остеопонтин, SDF-1 и др. [4, 5]. Для КН была показана важная роль эндоста, в первую очередь остеобластов (ОБ) в регуляции пролиферации и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [6]. Работа J.M. Gillette и соавт., опубликованная в журнале *Nature Cell Biology* в марте 2009 года, посвящена именно вопросам межклеточных коммуникаций ГСК-ОБ.

Работа выполнена на первичных CD34⁺ клетках, полученных от живых доноров, давших добровольное информированное согласие, а также клетках линий KG1a (клеточная линия ГСК, берущая своё начало из миелоидных гемопоэтических клеток больных эритролейкемией, утратившие миелоидные черты и приобретшие антигенные черты незрелых Т-клеток) [7], полученные в American Type Culture Collection. В качестве компонентов эндоста выступали нормальные человеческие остеобласты Lonza и клетки линии Saos 2 (Sarcoma Osteogenic — остеобласты, полученные у больной остеосаркомой 11-летней девочки) [8].

Как в случае нормальных ГСК, так и в случае KG1a, наблюдалась способность стволовых клеток перемещаться между остеобластами или Saos 2 и вступать с ними в контакт, изменяя свои морфологические свойства, что соответствует данным более ранних работ [9]. Исходя из гипотезы о важности поверхностных антигенов ГСК в создании контакта с ОБ, авторы исследовали распределение различных рецепторов на поверхности ГСК. Оказалось, что плотность VLA-4, корцептора к белку клеточной адгезии VCAM-1, значимо увеличена в контактной области, независимо от наличия или отсутствия контакта в настоящий момент. Подобная асимметрия наблюдалась у CD63 и CD81, принимающих участие в интегриновом взаимодействии между клетками. Полярным оказалось и распределение CD133 (проминина-1),

маркера стволовых клеток и ранних предшественников, а также его аналога, флуоресцентного фосфотидилэтаноламина (N-Rh-PE). Так, распределение N-Rh-PE было полярно в 97% (n = 115). Маркирование Qdot[®] также показало полярность мембраны, что говорит об асимметричном распределении антигенов, а не их перераспределении, т.к. QDot[®] могут быть удалены протеазой K. При этом распределение CD34, CD45 было симметричным, что свидетельствует в пользу специфичности распределения различных поверхностных антигенов ГСК и характеризует последние как полярные клетки, содержащие высокоспециализированные области.

При дехолистеринизации мембраны (обработка β-циклодекстринометиллом) наблюдали повторное перераспределение полярных антигенов (CD133-GFP, CD 63-Cherry, N-Rh-PE) в специализированные области мембраны, а при дестабилизации актина цитохалазином D эти маркеры рассеивались по мембране. Эти факты свидетельствуют о роли холестерин- и актин-зависимых механизмов в процессе поляризации мембраны ГСК.

Часто контакт ГСК-ОБ сохранялся более 5 ч. При конфокальной z-микроскопии было выявлено образование ГСК уropодий, вступающих в тесный контакт с ОБ. На уropодиях обнаруживаются высокие концентрации CD133-GFP, CD 63-Cherry и N-Rh-PE и низкие CD45, распределение, которое на поверхности ГСК не претерпевает существенных изменений.

При сканирующей электронной микроскопии обнаружили микроворсинки, подобные описанным в более ранних исследованиях [10]. Эти микроворсинки концентрируются в области контакта или в уropодиях, и, вероятно, служат для создания более тесного контакта между ГСК и ОБ. Микротрубочки также присутствуют в ГСК, но их распределение не связано с контактной областью или уropодиями.

Таким образом, зона контакта представляет собой сложную область, содержащую микроворсинки, маркеры стволовых клеток (CD133 и др.) и молекулы клеточной адгезии (VLA4, CD63, CD 81).

При культивировании ГСК, заранее меченных по различным антигенам контактных участков, с тубулин-положительными остеобластами показан переход различных маркеров (QDot[®], CD63-Cherry, CD-133-GFP, N-Rh-PE) к остеобластам. Причём QDot[®] оказывались не на поверхности клеток, а в областях, содержащих тубулин-YFP. В то же время CD 133 встроен в липидный бислой и может быть передан только вместе с участком плазмолеммы. Всё это подтверждает факт передачи участка мембраны контактной зоны от ГСК к ОБ.

Подобная передача не происходит при культивировании ГСК с клетками, не типичными для КН. Так, при культивировании ГСК с HeLa (одна из наиболее часто используемых в клеточной биологии и активных моделей культивируемых опухолевых тканей) в течение 3 ч факт передачи зафиксирован только в 20% случаев, тогда как при культивировании ГСК с остеобластами

в течение тех же 3 часов передача фиксировалась у 80% клеток. Отсутствие передачи при культивировании ГСК-ОБ в течение часа свидетельствует, что передача происходит только при непосредственном контакте двух клеток. Культивирование ГСК и ОБ, разделённых 0,4 микронным фильтром, не выявило передачи антигенов, что свидетельствует против участия в этом процессе экзосом, так как они представляют собой пузырьки размером 50–100 нм и способны проникать через такие фильтры.

Компоненты уроподий передавались остеобластам без существенного разрежения, что противоречит гипотезе о непосредственном смешении двух мембран и даёт основания предположить о поглощении участка мембраны путём цитофагоцитоза. Наиболее убедительно эта теория доказывается при культивировании CD34⁺ с примитивными остеобластами, в этом случае богатая N-Rh-PE область могла быть полностью передана остеобластам. Добавление динасора, ингибитора внутриклеточного белка динамина [10, 11], замедляло процесс передачи, что свидетельствует о важной роли динамина в этом процессе.

Также была исследована судьба полученных остеобластами веществ. Через 30 мин эти вещества определялись в различных компартментах клетки, в том числе положительных по Rab 5, Rab 7 (ГТФазы, регуляторы раннего и позднего эндосомального транспорта) и 2xFYVE (маркер фосфатидилинозитол-3-фосфата, участника сигнальной трансдукции, организации цитоскелета, апоптоза и компонент мембраны эндосом). Тот факт, что CD133-GFP сохраняется в ОБ в течение 12 ч, при полном разрушении за тот же период маркеров лизосомальной деградации, говорит о вовлечении переданных веществ в клеточный метаболизм без разрушения в лизосомах.

Также были определены структуры, содержащие переданные молекулы, в первую очередь положительных по 2xFYVE, т.к. большое количество FYVE-белков вовлечены в трансдукцию сигнала [12]. SARA (Smad anchor for receptor activator, якорь для Smad-рецепторной активации) является кофактором для Smad — цитоплазматического фактора-регулятора транскрипции, активируемый TGF-β (трансформирующий фактор роста β). Изучение ОБ, получивших N-Rh-PE и меченных

SARA-специфичными антителами, показало высокий уровень ко-локализации N-Rh-PE как с SARA, так и с Rab 7, относящимся к разным популяциям эндосом. Это позволило предположить, что антигены ГСК могут быть задействованы в SARA-положительных эндосомах.

Тот факт, что SARA-эндосомы осуществляют свою функцию через Smad [13], послужил поводом для изучения Smad в ОБ после межклеточной передачи. Оказалось, что в получивших N-Rh-PE остеобластах преобладает цитоплазматический, а в не получивших или культивируемых отдельно — ядерный Smad 2/3, т.е. при передаче происходило уменьшение количества TGF в сигнализации.

Существует гипотеза, по которой TGF-β может выступать как ингибитор взаимодействия ГСК-ОБ через SDF-1 [14]. Иммунофлуоресценция показала, что приблизительно 30% остеобластов экспрессируют SDF-1. Через один час сокультивирования 45% остеобластов, содержащих переданный материал, экспрессировали SDF-1. При сокультивировании в течение 5 ч. SDF-1 экспрессировали уже 75% остеобластов. Если после 1 ч сокультивирования ОБ разобщали с ГСК и культивировали их ещё 4 ч, то получали те же 75% SDF-1-положительных остеобластов — это говорит о том, что индуктором экспрессии SDF-1 является межклеточная передача, а не длительный контакт. При обработке культуры метил-β-циклодекстрином (10 мМ), цитохалазином D (2 мМ) или динасором (80 мМ), которые препятствуют передаче N-Rh-PE, обнаружили снижение экспрессии SDF-1, что ещё раз доказывает роль межклеточной эндосомальной передачи в регуляции синтеза белка в остеобластах, в частности, SDF-1.

Таким образом, в статье J.M. Gillette с соавт. дана оценка роли межклеточной передачи веществ от ГСК к остеобластам в костномозговых гемопоэтических клетках, подтвержден эндосомальный механизм передачи этих веществ, частично описана судьба этих веществ в остеобласте. Выдвинута теория о роли этих сигналов в метаболизме TGF-β посредством участия в Smad-опосредованной индукции транскрипции (полученные от ГСК вещества встраиваются в SARA-положительные эндосомы). Показана роль межклеточного транспорта и TGF-β в индукции синтеза SDF-1, остеобластического регулятора хоуминга ГСК.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis. *Blood Cells* 1978; 4: 7-25.
2. Islam A. The origin and spread of human leukemia. *Med. Hypot.* 1992; 39: 110-8.
3. Морозова В.Т. Лейкозы — болезни стромы кроветворных органов (гипотеза). *Клиническая лабораторная диагностика* 1999; 6: 3-13.
4. Eaves C. J. SDF-1 tells stem cells to mind their P's and J's. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(1): 27-9.
5. Леляевский А. Ниша гемопоэтических стволовых клеток in vivo: «увидеть своими глазами». *Клет. Транспл. и Ткан. Инж.* 2009; 4(1): 21-4.
6. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425(6960): 841-6.
7. Furley A.J., Reeves B.R., Mizutani S. et al. Divergent molecular phenotypes of KG1 and KG1a myeloid cell lines. *Blood* 1986; 68: 1101-07.
8. Rodan S.B., Imai Y., Thiede M. et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res.* 1987; 47(18): 4961-6.
9. Wilson A., Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic stem cell niches. *Nature Rev. Immunol.* 2006; 6: 93-106.

10. Freund D., Bauer N., Boxberger S. et al. Polarization of human hematopoietic progenitors during contact with multipotent mesenchymal stromal cells: effects on proliferation and clonogenicity. *Stem Cells Dev.* 2006; 15: 815-29.
11. Damke H., Baba T., Warnock D., Schmid S. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* 1994; 127: 915-34.
12. Macia E., Ehrlich M., Massol R. et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* 2006; 10: 839-50.
13. Valdez G., Philippidou P., Rosenbaum J. et al. Trk-signaling endosomes are generated by Rac-dependent macroendocytosis. *PNAS* 2007; 104: 12270-5.
14. Runyan C. E., Schnaper H. W., Poncelet A. C. The role of internalization in transforming growth factor β1-induced Smad2 association with Smad anchor for receptor activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 8300-8.
15. Dar A., Goichberg P., Shinder V. et al. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nature Immunol.* 2005; 6: 1038-46.

Подготовил М.А. Реутин

По материалам: Gillette J. M., Laroche A., Dunbar C E., Lippincott-Schwartz J. Intercellular transfer to signalling endosomes regulates an ex vivo bone marrow. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11(3): 303-12

Разработана эффективная технология для предупреждения наследственных митохондриальных болезней

Митохондриальные болезни представляют собой одну из наиболее распространенных групп наследственных болезней человека и встречаются с частотой один случай на 3,5–6 тыс. человек [1]. В основном они характеризуются поражением нервной и мышечной системы, благодаря чему появилось их другое название — митохондриальные миопатии [2]. Причина данных болезней лежит в мутациях митохондриальной ДНК, которые в большинстве случаев негативно влияют на биосинтез белков, задействованных в энергетическом метаболизме клетки. Этим и объясняется негативное влияние митохондриальных болезней, большей степенью на нервную и мышечную системы, так как клетки данных систем характеризуются высокой интенсивностью выработки и потребления энергии, и, соответственно, они наиболее чувствительны к патологическим изменениям энергетического обмена.

К настоящему времени не существует эффективных лекарственных средств для терапии данной группы

заболеваний, а все доступное лечение носит симптоматический характер. Профилактика митохондриальных болезней при искусственном оплодотворении сводится к генетическому анализу митохондриальной ДНК в рамках преимплантационной генетической диагностики и имплантации эмбрионов, которые не несут соответствующих мутаций в митохондриальном геноме [3].

В статье М. Tachibana и соавт. [4], вышедшей в журнале Nature, впервые предложена технология, направленная на предотвращение развития митохондриальных болезней. Суть предложенного метода, разработанного в лаборатории Шухрата Миталипова, состоит в переносе геномной ДНК из материнской клетки, митохондриальная ДНК которой имеет мутации, в донорский овоцит с нормальным геномом митохондрий (рис.).

В своих экспериментах исследователи использовали клетки резус-макака. Для переноса ядерной ДНК был использован метод переноса веретено-хромосомного комплекса (spindle–chromosomal complex transfer, ST).

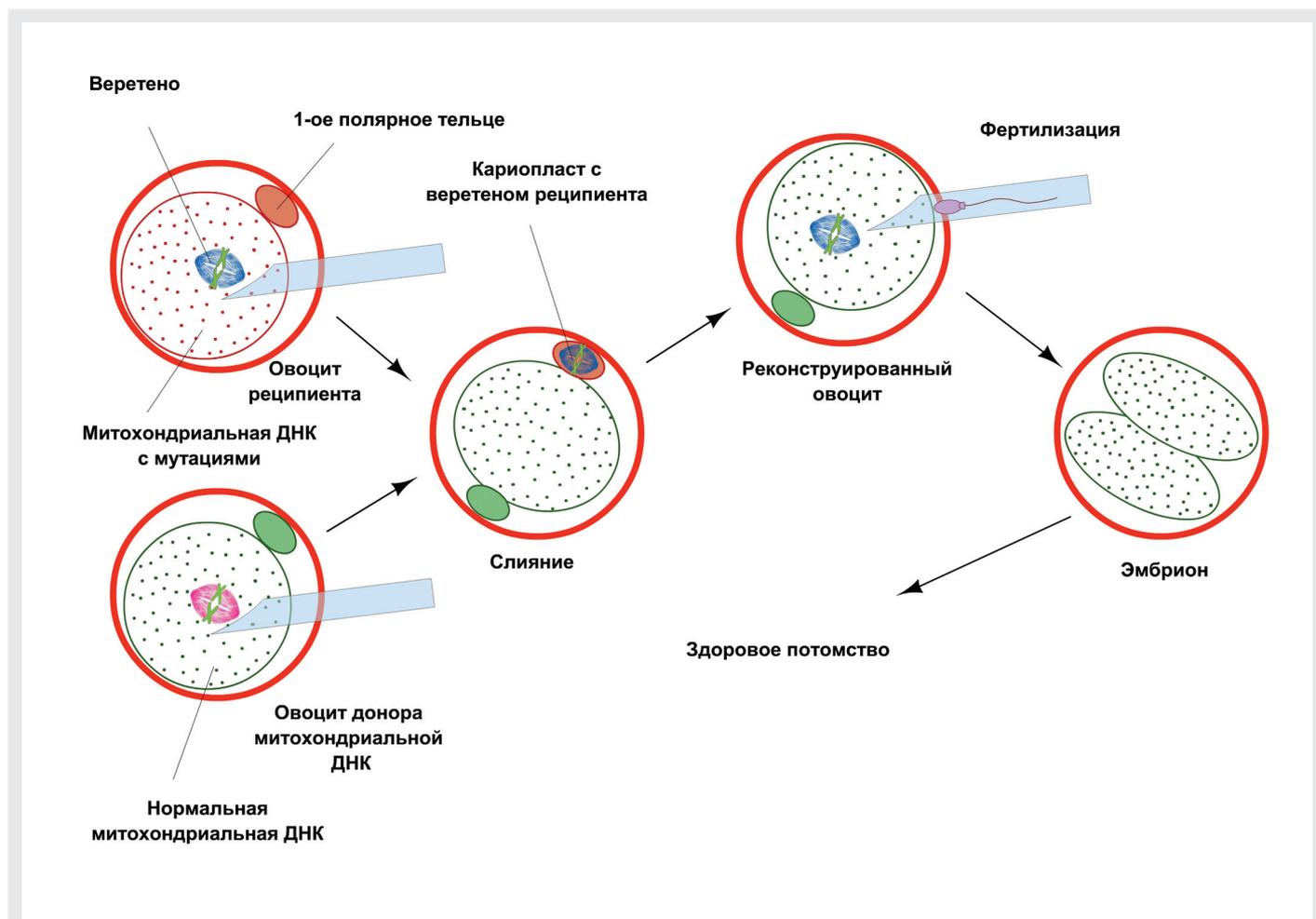


Схема описанного в статье метода «переноса веретено-хромосомного комплекса» (spindle–chromosomal complex transfer, ST)

Данный метод дает возможность перенести геномную ДНК из донорского овоцита, находящегося на стадии метафазы II, в перивителлиновую полость безъядерного овоцита. Для слияния исследователи сначала использовали метод электропорации, но было обнаружено, что это вызывает активацию дальнейшего деления овоцита с образованием полярных телец. Для устранения этого артефакта было предложено использовать альтернативную технику слияния с помощью вируса Сендай, что позволило избежать нежелательной активации клеточного деления овоцита.

После этого была проведена проверка репродуктивной эффективности реконструированных овоцитов и чистоты переноса митохондриальной ДНК с помощью метода ST. Из гибридных бластоцист были получены две линии эмбриональных стволовых клеток (STES-1 и STES-2), которые несли на своей поверхности типичные маркеры плюрипотентности, такие как OCT4, SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81 и имели нормальный кариотип. In vivo проверка репродуктивного потенциала нового метода проводилась путем имплантации ST-эмбрионов самкам резус-макак. Процент фертилизации и образования 8-клеточного эмбриона, морулы и бластоцисты был близким к показателям контрольной группы, в которой самкам имплантировались нативные овоциты и намного превосходил

результаты, полученные при использовании для слияния метода электропорации. Из девяти беременных самок три родили четверых детенышей (одна двойня). Все они характеризовались нормальным развитием.

Исследование митохондриальной ДНК детенышей путем анализа гипервариабельного района Д-петли 1 [5], RT-PCR и рестрикционного анализа показал, что во всех исследованных образцах присутствовала митохондриальная ДНК только от овоцита-акцептора.

Опираясь на вышеописанные результаты можно утверждать, что авторам удалось разработать эффективный метод переноса геномной ДНК в клетки млекопитающих. Особую важность представляет тот факт, что исследователи впервые избежали гетероплазмии митохондриальной ДНК в акцепторных клетках, чего не удавалось достичь при использовании уже существующих методов [6–8].

Несмотря на все достоинства и перспективы, данный метод, как и отмечают сами авторы работы, имеет существенный недостаток, который состоит в использовании вируса для слияния кариопласта и цитопласта. Хотя проведенная проверка показала отсутствие вирусного генома в ST-клетках, риск все равно остается, что может быть основным сдерживающим фактором при внедрении данного метода в практику.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Taylor R.W., Turnbull D.M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Rev. Genet.* 2005; 6: 389–402.
2. Finsterer J. Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders. *Acta Haematol.* 2007; 118 (2): 88–98.
3. Steffann J., Frydman N., Gigarel N. et al. Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J. Med. Genet.* 2006; 43: 244–7.
4. Tachibana M., Sparman M., Sritanaudomchai H. et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 2009; 461: 367–72.

5. Byrne J.A., Pedersen D., Clepper L. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450: 497–502.
6. Meirelles F.V., Smith L.C. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics* 1997; 145: 445–51.
7. Meirelles F.V., Smith L.C. Mitochondrial genotype segregation during preimplantation development in mouse heteroplasmic embryos. *Genetics* 1998; 148: 877–83.
8. Sato A., Kono T., Nakada K. et al. Gene therapy for progeny of mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation. *PNAS* 2005; 102: 16765–70.

Подготовил В.В. Стадник

По материалам: Tachibana M., Sparman M., Sritanaudomchai H. et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 2009; 461: 367–72

С помощью трансплантации эмбриональных стволовых клеток получены устойчивые к инфаркту миокарда животные

В настоящее время клеточная терапия считается одним из перспективных подходов в лечении пациентов, перенесших инфаркт миокарда [1–3]. Трансплантации некоторых видов клеток-предшественниц после инфаркта миокарда у человека показали, что трансплантированные клетки не только вносят вклад в посттравматическую регенерацию сердечной мышцы, но и стимулируют процесс образования новых кардиомиоцитов из эндогенных тканевых и циркулирующих в кровотоке прогениторных клеток, принимающих активное участие в процессе регенерации [4–8]. Тем не менее, такой подход, обеспечивая коррекцию структуры и функции органа после повреждения, не может гарантировать

предотвращение повторного инфаркта. Иными словами, клеточная терапия до настоящего времени рассматривалась исследователями и клиницистами исключительно в лечебных, но не в профилактических целях.

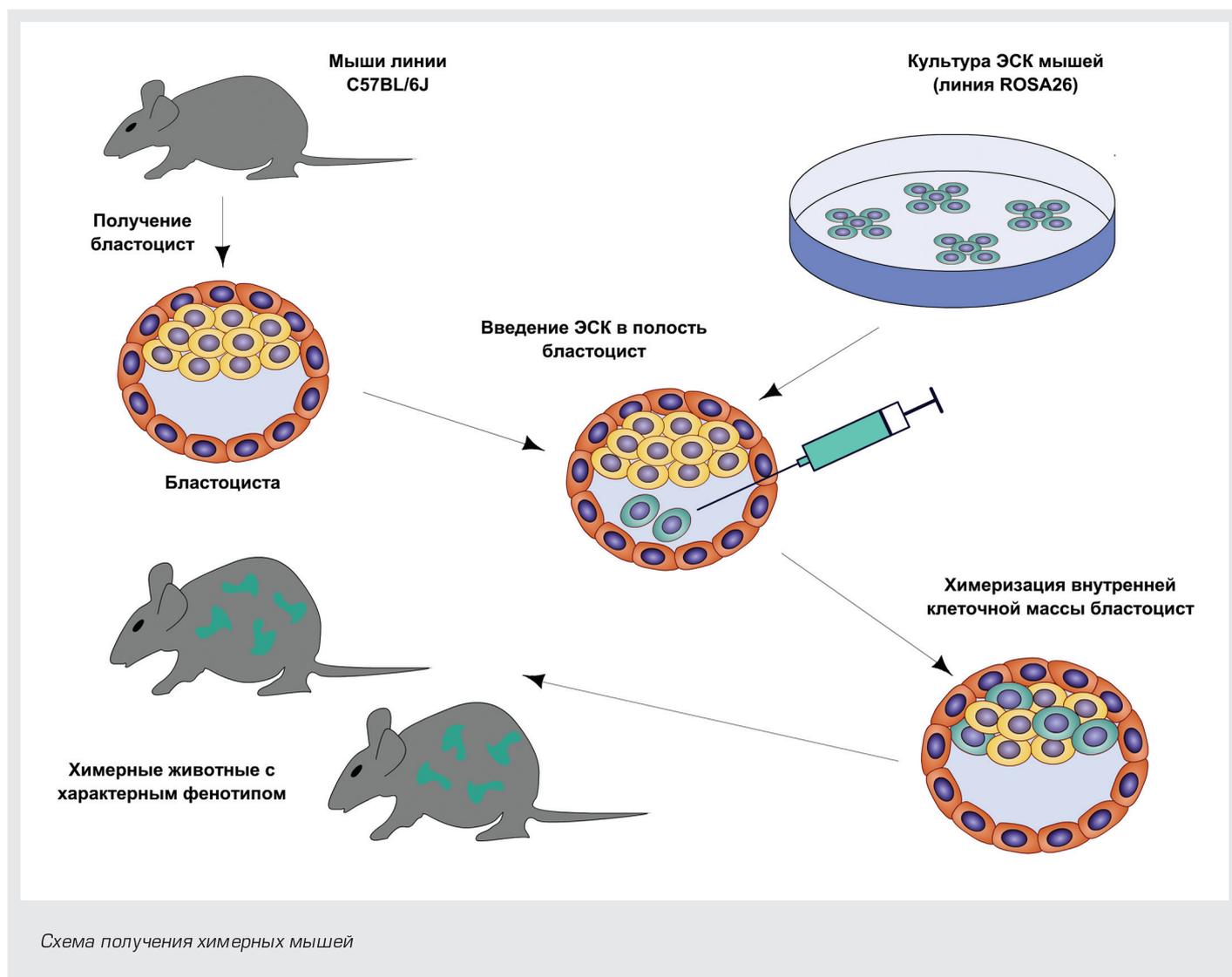
Научная группа под руководством S. Yamada впервые задалась вопросом о том, насколько экзогенные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) могут влиять на восприимчивость к инфаркту миокарда и посттравматические репаративные процессы, будучи трансплантированными задолго до развития патологии на самых ранних этапах развития организма. При планировании своих экспериментов исследователи основывались на результатах более ранней работы, где было показано,

что трансплантация аллогенных ЭСК в бластоцисты мышей с летальной мутацией в одном из генов, ответственных за развитие сердца, приводит к выживанию эмбрионов до момента рождения, в то время как без трансплантации ЭСК такие эмбрионы гибнут в середине периода гестации [9]. Тем не менее, до сегодняшнего дня оставалось неизвестным, насколько трансплантация ЭСК может повлиять на восприимчивость к кардиологическим заболеваниям у взрослых животных, не имеющих генетических дефектов.

В своих экспериментах исследователи использовали бластоцисты до стадии имплантации, полученные от мышей линии C57BL/6J. В бластоцисты инъектировали ЭСК линии ROSA26, конститутивно экспрессирующие маркерный трансген (β -галактозидазу). Было показано, что вводимые ЭСК успешно встраиваются во внутреннюю клеточную массу бластоцист. Полученные химерные бластоцисты реимплантировали самкам мышей и оценивали эффекты трансплантации ЭСК на физиологию развившегося из них потомства, а также на устойчивость химерных животных к инфаркту миокарда. Исследователи показали, что клетки, дифференцировавшиеся из трансплантированных ЭСК, присутствуют в тканях, развившихся из бластоцист животных, в том числе в их миокарде. Интересно отметить, что рост химерных мышей в сравнении с животными из контрольной группы

(интактные мыши линии C57BL/6J) значительно ускорился, и к 8 месяцам развития их вес превышал вес животных из группы контроля в 1,5 раза. Это происходило благодаря излишним отложениям у химерных животных подкожного и висцерального жира, что, тем не менее, не было ассоциировано у них с повышенным давлением и склонностью к диабету.

У животных из контрольной и экспериментальной групп не отличались эхокардиографические характеристики сердечной деятельности, а также анатомические характеристики сердца, включая вес органа и расположение коронарных артерий. Когда возраст животных достигал 12–14 месяцев, им проводилось моделирование инфаркта миокарда путем перевязки передней ветви левой коронарной артерии. Результаты наблюдений за восстановлением животных оказались ошеломляющими. После перевязки артерии смертность в группе контроля достигала 41%, в то время как среди химерных животных она составляла 0%. После повреждения в сердце животных из контрольной группы начинался процесс разрастания зоны акинеза, в то время как у химерных животных сердечная деятельность стремительно восстанавливалась. Спустя месяц после операции у химерных животных полностью восстанавливалось нормальное анатомическое и гистологическое строение поврежденной стенки левого желудочка, а также



электрофизиологические параметры сердечной деятельности. В миокарде химерных животных не отмечалось признаков фиброза, а иммуногистохимическое окрашивание гистологических срезов ткани показало, что в миокарде после инфаркта резко возрастает количество пролиферирующих клеток, экспрессирующих ядерный маркер Ki67, а также маркеры стволовых клеток c-Kit и Sca-1. У химерных животных не развивалась хроническая левожелудочковая недостаточность. Восстановление состояния животных было подтверждено функциональными тестами на беговой дорожке (treadmill-тест).

У животных из группы контроля подобного не происходило: у них, напротив, развивалась тяжелая хроническая сердечная недостаточность, обусловленная фиброзным перерождением стенки левого желудочка, ее истончением и связанным с этим патологическим расширением желудочка. Пролиферация клеток-предшественниц в миокарде контрольных животных оставалась на низком уровне, что и явилось причиной невозможности восстановления структуры сердечной мышцы. Угнетение сердечной деятельности приводило к застою жидкости в легких и их отеку. Результаты функциональных тестов (время бега в treadmill-тесте и переносимость нагрузок), показанные мышцами из контрольной группы, также были в разы хуже, чем у химерных животных.

Авторы работы считают, что в будущем трансплантация экзогенных ЭСК в бластоцисты человека может стать методом профилактики кардиологических заболеваний. Тем не менее, эта работа оставляет гораздо больше вопросов, чем ответов, и ее трудно назвать доклиническим исследованием возможностей применения стволовых клеток для профилактики инфаркта миокарда. Основным вопросом остается механизм, лежащий в основе полученного результата. Указывая на повышение количества делящихся прогениторных клеток в миокарде химерных животных после инфаркта в сравнении с животными из контрольной группы, исследователи не проверяют экспрессии маркерного трансгена ЭСК в клетках-предшественницах кардиомиоцитов. По этой причине происхождение активно делящихся клеток в миокарде остается неясным. Также S. Yamada и его коллеги показали, что в организме химерных животных, за счет обнаруженной у них избыточной жировой ткани, содержится в 2–3 раза больше мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), чем у животных из группы контроля. Известно, что данные клетки способны мигрировать в зоны повреждения миокарда и принимать участие в регенерации ткани, а многочисленные исследования трансплантации ММСК после инфаркта миокарда продемонстрировали положительный эффект клеточной терапии [10–12].

Тем не менее, авторы работы, упоминая про ММСК, не указывают, несли ли данные клетки маркерный трансген трансплантированных аллогенных ЭСК и принимали ли они участие в регенерации сердечной мышцы у химерных животных. Поэтому вряд ли возможно связать устойчивость к инфаркту миокарда с увеличением количества ММСК в организме химерных животных, обусловленное трансплантацией ЭСК в бластоцисту. Если

бы клетки-предшественницы кардиомиоцитов и ММСК в организме химерных животных несли в себе маркерный трансген, можно бы было заключить, что введение в бластоцисту экзогенных ЭСК приводит к тому, что в организме животного к моменту взросления образуется больше, чем в норме, стволовых элементов — тканеспецифичных стволовых клеток, ведущих свое происхождение от ЭСК [13].

Мыши линии ROSA26 не являются менее восприимчивыми к инфаркту миокарда, чем мыши линии C57BL/6J [14], однако специальных исследований, направленных на выяснение этого факта, не проводилось. По этой причине устойчивость к инфаркту миокарда у химер вряд ли может быть объяснена характеристиками конкретной линии ЭСК, которые передаются химерным животным.

Следует отметить очевидные минусы работы, не позволяющие с уверенностью строить гипотезы о механизмах полученного эффекта: во-первых, количество химерных животных, полученных исследователями, составляло всего 7 штук, причем в статистической оценке параметров сердечной деятельности, гистологическом и морфометрическом анализе учитывались данные, полученные по 3–4 животным. Приведенные в статье иллюстрации, демонстрирующие изменение сократительной функции сердца экспериментальных животных в динамике после перевязки передней левой коронарной артерии, демонстрируют, что у химерных животных инфаркт фактически не развивался. Возможно, это связано с особенностями кровоснабжения сердца химерных животных — при оценке сосудистой сети в сердце животных авторы ограничились осмотром расположения основных коронарных артерий, не уделив внимания возможному присутствию мелких коллатеральных сосудов. Фотографии гистологических препаратов сердца химерных животных через 1 месяц после индукции инфаркта демонстрируют картину интактного сердца без каких-либо следов процессов репарации, что также косвенно указывает на то, что у химерных животных после перевязки передней ветви левой коронарной артерии инфаркт не развивался. Более хорошо развитая кровеносная система органа у химерных животных в сравнении с контрольными также могла бы послужить объяснением их устойчивости к перевязке коронарной артерии и быстрого восстановления их нормального состояния.

Можно предположить, что трансплантация ЭСК в бластоцисту должна оказывать влияние не только на постинфарктную репарацию, но на более эффективное восстановление состояния организма после самых разнообразных травматических повреждений. Тем не менее, на данный момент эта работа — единственная в своем роде, и на ее основе сложно рассуждать о возможности подобного эффекта. Также в исследовании не была оценена общая продолжительность жизни химерных животных в сравнении с животными из группы контроля без индукции экспериментального инфаркта миокарда. В то же время, это крайне интересно, поскольку могло бы выявить возможные побочные эффекты трансплантации ЭСК в бластоцисту на онтогенез развившегося из нее организма.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Segers V.F., Lee R.T. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 2008; 451: 937–42.
2. Wu S.M., Chien K.R., Mummery C. Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. *Cell* 2008; 132: 637–43.
3. Dimmeler S., Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ. Res.* 2008; 102: 1319–30.
4. Quaini F., Urbanek K., Beltrami A.P. et al. Chimerism of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 5–15.

5. Kajstura J., Hosoda T., Bearzi C. et al. The human heart: A self-renewing organ. *Clin. Translat. Sci.* 2008; 1: 80–6.

6. Deb A., Wang S., Skelding K.A. et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003; 107: 1247–9.

7. Kubo H., Jaleel N., Kumarapeli A. et al. Increased cardiac myocyte progenitors in failing human hearts. *Circulation* 2008; 118: 649–57.

8. Rupp S., Koyanagi M., Iwasaki M. et al. Characterization of long-term endogenous cardiac repair in children after heart transplantation. *Eur. Heart J.* 2008; 29: 1867–72.

9. Fraidtenraich D., Stillwell E., Romero E. et al. Rescue of cardiac defects in id knockout embryos by injection of embryonic stem cells. *Science* 2004; 306: 247–52.

10. Joggerst S.J., Hatzopolous A.K. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2009; 11: e20.

11. Madonna R., Geng Y.J., De Caterina R. Adipose tissue-derived stem cells. Characterization and potential for cardiovascular repair.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009; 29: 1723.

12. Sensebй L., Krampere M., Schrezenmeier H. et al. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 2009; in print.

13. Otto A., Collins-Hooper H., Patel K. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J. Anat.* 2009; 5(215): 477–97.

14. Barandon L., Couffinhal T., Dufourcq P. et al. Repair of myocardial infarction by epicardial deposition of bone-marrow-cell-coated muscle patch in a murine model. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 78: 1409–17.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Yamada S., Nelson T.J., Behfar A. et al. Stem cell transplant into pre-implantation embryo yields myocardial infarction-resistant adult phenotype. *Stem Cells* 2009; in print

Развитие скелетных мышц и их регенерация из миосателлитоцитов реализуются за счет различных генетических программ

Регенерация скелетных мышц имеет важное клиническое значение при мышечных дистрофиях и различных травмах, и зависит от камбиального резерва, формируемого клетками-миосателлитами. Как формирующие скелетное мышечное волокно миобласты, так и клетки-миосателлиты образуются из единых мышечных предшественников с высоким пролиферативным потенциалом [2]. После завершения формирования мышечного волокна во время эмбрионального развития скелетной мышцы клетки-миосателлиты располагаются вне многоядерного волокна и остаются пролиферативно-неактивными. Выживание и распространение этих клеток основано на экспрессии транскрипционного фактора Pax7 [2].

Исследования *in vitro* подтверждают важную роль Pax7 в процессах выживания миобластов, их пролиферации и установлении миогенного фенотипа [1–2]. Также было показано, что в покоящихся клетках-миосателлитах наблюдается постоянная экспрессия Pax7 [3]. Основываясь на этих данных, исследователи из отдела эмбриологии института Карнеги Christoph Lepper и Chen-Ming Fan решили проверить гипотезу о том, что влияние Pax7 ответственно за самообновление и вызванную травмами регенерацию скелетных мышц *in vivo*.

В опубликованном в журнале *Nature* исследовании была прослежена судьба миосателлитов с инактивированным геном Pax7 у мышей. Инактивация происходила в результате Cre-опосредованной рекомбинации двух аллельных вариантов гена Pax7: Pax7^f и Pax7^{CE}. Были использованы мыши линии Rosa26, характеризующиеся экспрессией lacZ после Cre-опосредованной рекомбинации. Зависящая от тамоксифена активность CreERT2 подтверждалась β-галактозадазной активностью.

В результате, на 5 и 10 сут. после травмы, вызванной кардиотоксином, у гетерозиготных по аллельным вариантам гена Pax7 (Pax7^{+/CE}) мышей на 60–90 сут. после рождения все мышечные волокна, полученные в результате регенерации, оказались β-гал⁺. Это показывает, что основным источником регенерирующих волокон являются потомки клеток, экспрессирующих Pax7.

Оказалось неожиданным, что и у мышей с полностью выключенным геном Pax7 миофибриллы регенерировали, причем в волокнах не было обнаружено ни мРНК Pax7, ни самого белка Pax7. Таким образом, функциональный белок Pax7 не требуется для регенерации скелетных мышц после травмы во взрослом возрасте.

У мутантов Pax7^{-/-} в зародышевой линии, напротив, после травмы регенерировали лишь редкие тонкие волокна. Более того, считается [4], что эти фибриллы имеют иное, не Pax7-зависимое, происхождение. У таких мутантов выжившие изолированные клетки не обладали типичными характеристиками миосателлитов. Исследователи провели анализ судьбы клеток, участвующих в регенерации миофибрилл у таких мутантов, используя в качестве метки 5-этинил-2'-дезоксисуридин, и обнаружили, что потомки клеток Pax7⁻ не только формируют волокно, но и занимают нишу клеток-сателлитов.

Наиболее вероятными кандидатами для функциональной замены Pax7 в данном случае являются другие представители семейства Pax. Известно, что Pax3 и Pax7 могут замещать друг друга в эмбриональном миогистогенезе [1]. Для проверки гипотезы о возможном замещении Pax7 на Pax3 во время процесса мышечной регенерации у взрослых мышей исследователи выключили оба гена. Оказалось, что ни Pax7, ни Pax3 не влияют на регенерацию скелетных мышц у взрослых организмов.

Следующей задачей исследования стало определение критического периода влияния Pax7 на регенерацию *in vivo*.

В результате оказалось, что регенерация мышечных фибрилл перестает быть зависимой от клеток-потомков Pax7⁺ предшественников после 21 сут. постнатального развития. Именно на этом сроке развития завершается формирование «архитектурного облика» мышечного волокна, распределяются ядра, и обособляются молчащие клетки-миосателлиты [5]. Потомки клеток-мутантов по Pax7, напротив, сливались в фибриллу только после 31 сут. постнатального развития.

Результатами своего исследования авторы считают, в первую очередь, открытие факта, что белок Pax7 функционально не только координирует выживание и пролиферацию клеток-миосателлитов, но и предотвращает их дифференцировку и слияние в мышечное волокно, сохраняя потенциал к регенерации у клеток-миосателлитов. Также был определен критический период зависимости от Pax7 во время перехода от миосателлитов к состоянию стволовых клеток, обеспечивающих скелетным мышцам способность к регенерации. Этот период у мышей заканчивается на 21 сут. после рождения. Показана неотъемлемая роль Pax3 и Pax7 для эмбриональных мышечных предшественников, и роль только одного Pax7 для перинатальных. Совершенно неожиданно оказалось, что взрослые клетки-

сателлиты не нуждаются ни в Pax3, ни в Pax7 для осуществления процессов мышечной регенерации.

Авторы серьезно пошатнули господствующую концепцию о том, что «регенерация повторяет развитие». Изменения в генетической программе мышечных стволовых клеток при переходе от эмбриональной стадии к ювенильной и далее к стадии взрослого организма подталкивает к осторожности в применении знаний, полученных при эмбриональных исследованиях, к биологии стволовых клеток взрослых. Зависимые от возраста изменения в свойствах стволовых клеток убеждают в необходимости тщательного анализа возраста клеточного материала, используемого при трансплантациях в регенеративной медицине.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Relaix F., Rocancourt D., Mansouri A., Buckingham M.A. Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 2005; 435: 948–53.
2. Charge S.B., Rudnicki M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 209–38.
3. Seale P., Ishibashi J., Scime A., Rudnicki M.A. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD451:Sca11 stem cells

from injured muscle. *PLoS Biol.* 2004; 2: E130.

4. Kuang S., Charge S.B., Seale P., Huh M., Rudnicki M.A. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J. Cell Biol.* 2006; 172: 103–13.
5. Pastoret C., Sebille A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve* 1995; 18: 1147–54.

Подготовил А.В. Иванов

По материалам: Lepper C., Conway S.J., Fan C-M. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* 2009; 460: 627–31. Wang J., Conboy I. Embryonic vs. Adult Myogenesis: Challenging the 'Regeneration Recapitulates Development' Paradigm. *Journal of Molecular Cell Biology.* 2009; 1–4

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Формирование полноценных зубов из биоинженерных эквивалентов

Разработка и применение биотехнологических подходов требует понимания процессов клеточной биологии, эмбрионального гисто- и органогенеза, особенностей физиологической и репаративной регенерации в различных возрастных периодах. В настоящее время большинство исследований в области клеточных технологий сфокусированы на тканевом уровне организации — полное воспроизведение органогенеза на современном этапе представляется мало возможным, но является дальнейшим логическим продолжением развития научных разработок.

В этой связи, особый интерес представляет серия экспериментальных исследований лаборатории К. Накао, направленных на получение биоинженерных эквивалентов зубов и оценку их гистологических, гистохимических, иммунофенотипических и функциональных особенностей.

Известно, что формирование зубных зачатков осуществляется на основе взаимодействия орального эпителия и клеток эктомезенхимы нервного гребня [2].

Руководствуясь этими данными, К. Накао с соавт. (2007) использовали в качестве исходного материала эпителиальные и мезенхимные клетки, полученные из зачатков резцов эмбрионов мышей возрастом 14,5 дней. Инъекции клеточных популяций проводили в капли коллагенового геля с получением культур в различных концентрациях ($0,5 \cdot 10^8$ и $5 \cdot 10^8$ клеток/мл). Мезенхимные клетки помещались в базальную часть, а эпителиальные — в апикальную. На этапе разработки метода [2] после двух сут. культивирования половину образцов трансплантировали под капсулу почки мыши на две недели. Аналогичное время оставшуюся часть клеточных культур инкубировали *in vitro*. Формирование зубных зачатков с нормальной дифференцировкой клеток и гистогенезом наблюдалось во всех случаях *in vivo* при использовании материала с высокой плотностью клеток (концентрация $5 \cdot 10^8$ клеток/мл). С использованием GFP-меченых клеточных популяций было показано развитие одонтобластов, компонентов пульпы зуба, костной ткани

и периодонтальной связки из мезенхимальных клеток, а амелобластов — из эпителиальных, что соответствует фундаментальным представлениям. Важно, что при использовании клеточных популяций, полученных из зубных зачатков резцов на более поздних стадиях эмбрионального развития, биоинженерные эквиваленты зубов формировались с гораздо меньшей частотой.

При культивировании клеток в коллагеновом геле *in vitro* также наблюдалось формирование множественных зубных зачатков к периферии от пограничной линии между эпителиальными и мезенхимными клетками уже через 2–3 дня инкубирования. В последующем происходила дифференцировка клеток в одонтобласты и амелобласты, продукция ими межклеточного вещества.

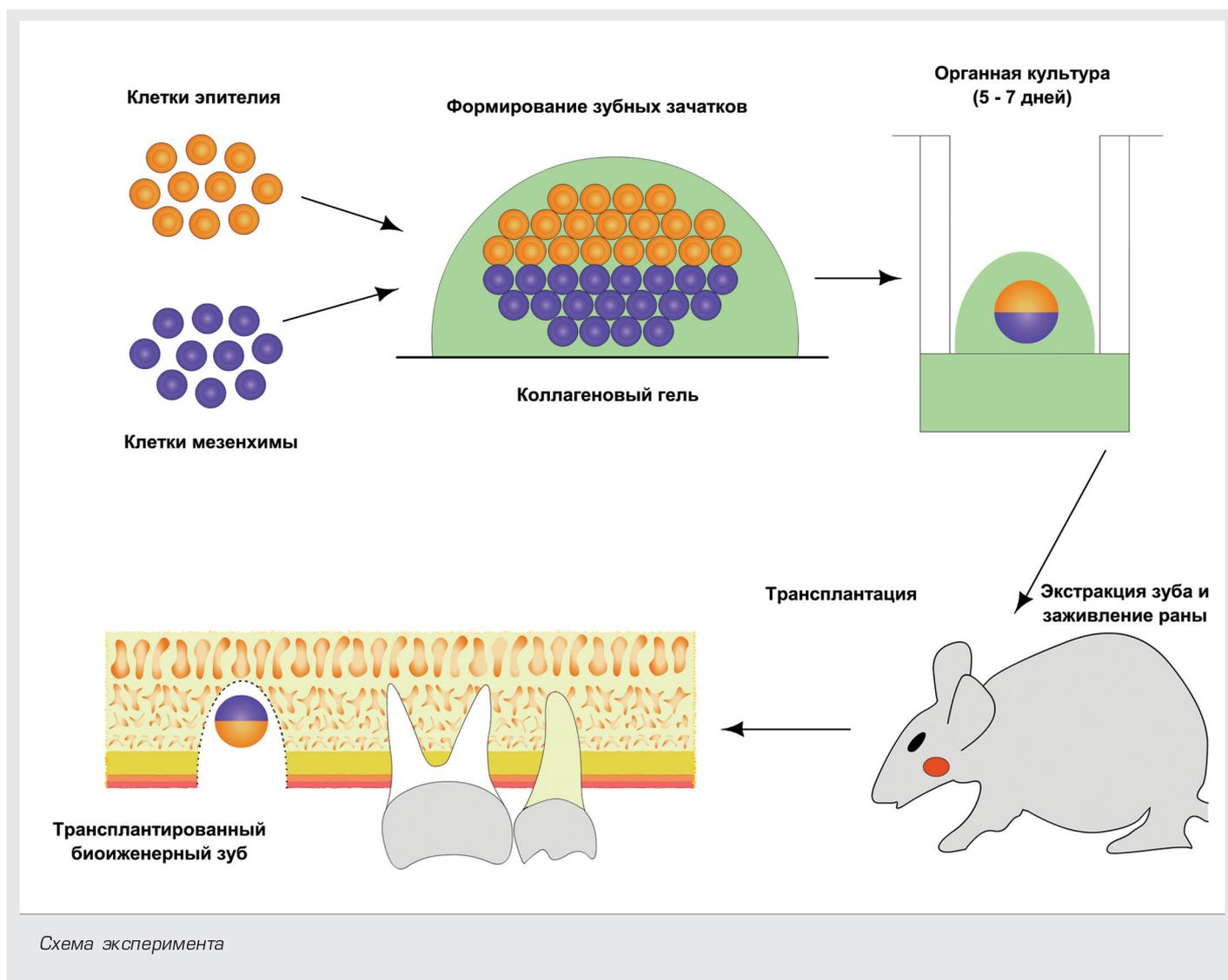
Клеточные компоненты всех биоинженерных эквивалентов зубов, полученных как *in vivo*, так и *in vitro* характеризовались экспрессией белков (эктодин, рецептор эктодисплазина), регулирующих процесс гистогенеза зубов в физиологических условиях [3].

Положительные результаты на первых этапах исследования позволили авторам перейти к оценке возможности получения нормальных зубов из их биоинженерных эквивалентов непосредственно в области их естественной локализации. Для этого, привитые в течение 14 сут. под капсулой почки зубные зачатки и культуры, инкубированные *in vitro* двое сут., трансплантировались

8-недельным мышам в область удаленного резца нижней челюсти. Спустя 14 сут. в обеих группах формировались зубы с правильной гистоархитектоникой, наличием периодонтальной связки и пульпой с сосудами и нервами.

Заключительный этап экспериментального исследования, опубликованный в журнале *Nat. Methods* в 2009 г. [4] был направлен на оценку функциональных особенностей коренных зубов, получаемых после трансплантации, соответствие их по физиологическим и биомеханическим характеристикам нормальным зубам.

Полученные *in vitro* зубные зачатки трансплантировались в область удаленного за три недели до операции верхнего первого большого коренного зуба. В более чем 55% случаев зуб прорезался (в среднем через 36 сут.) и через две недели достигал жевательной поверхности противоположного зуба нижней челюсти, после чего рост прекращался, что доказывает чувствительность восстановленного зуба к регуляции механической нагрузкой. Неудачные результаты (45%), по мнению авторов, связаны с погрешностями в осуществлении микрохирургических манипуляций. Полученные зубы имели нормальное строение, корни были окружены цементом и периодонтальной связкой. Кроме того, характеризовались наличием бугорков на жевательной поверхности, но меньшими размерами коронки в передне-заднем и щечноязычном направлениях.



Оценку твердости, определяющей жевательную функцию зубов, оценивали с помощью теста твердости Кнупа. Нормальный показатель, характерный для коренных зубов мышей возрастом 9 недель, равен в среднем 88 единицам, чему соответствовала твердость биоинженерных зубов. Более того, исследователи оценивали взаимодействие корней с окружающей их костной тканью, т.е. функционирование периодонтальной связки. Известно, что в физиологических условиях в точке компрессии костной ткани запускаются процессы резорбции, опосредованные действием остеокластов, а в области растяжения — остеогенез [3]. В этой связи, при выполнении постоянной механической нагрузки на биоинженерные зубы в щечном направлении (в течение 17 сут.) было показано, что в области компрессии кости локализуются остеокласты (положительная реакция на тартрат-резистентную кислую фосфатазу), а на противоположной, язычной стороне — остеобласты (остеокальцин-позитивные), что подтверждает вовлеченность периодонтальной связки в передачу механической нагрузки костной ткани.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ohazama A., Modino S.A. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J. Dent. Res.* 2004; 83(7): 518-22.
2. Pispas J., Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev. Biol.* 2003; 262: 195-205.
3. Wise G.E., King G.J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J. Dent. Res.* 2008; 87: 414-34.
4. Deguchi T., Takeshita N., Balam T.A. et al. Galanin-immunoreactive nerve fibers in the periodontal ligament during experimental tooth

В заключении авторы оценивали проводимость ноцицептивной импульсации по нервным окончаниям пульпы зуба. Для этого устанавливали уровень экспрессии нейротрансмиттеров, участвующих в восприятии и проведении болевых раздражений (галанин, galanin) [4], пептид, связанный с геном кальцитонина (calcitonin gene-related peptide, CGRP [5]). Был показан высокий уровень продукции CGRP, а также закономерное увеличение экспрессии галанина при болевой стимуляции.

Таким образом, в серии исследований был отработан метод воспроизведения эмбрионального органогенеза *in vitro*, обоснована эффективность применения клеточных продуктов, сформированных на его основе, в эксперименте *in vivo*, а также показаны впечатляющие функциональные результаты трансплантации полученных биоинженерных эквивалентов. Нужно отметить, что данное исследование, базирующееся на использовании эмбрионального клеточного материала, имеет, главным образом, теоретическое и экспериментальное значение, позволяя продвинуться в изучении процессов эмбрионального гисто- и органогенеза, но пока не применимо в клинической практике.

movement. *J. Dent. Res.* 2003; 82: 677-81.

5. Byers M.R., Narhi M.V. Dental injury models: Experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1999; 10: 4-39.
6. Nakao K., Morita R., Saji Y. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat. Methods* 2007; 4(3): 227-30.
7. Ikeda E., Morita R., Nakao K. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *PNAS* 2009; 106(32): 13475-80.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Ikeda E., Morita R., Nakao K. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *PNAS* 2009; 106(32): 13475-80

Новый подход к разработке тканеинженерных конструкций: первый опыт создания «безматричного» эквивалента сердечной мышцы

Применение тканеинженерных конструкций на основе клеток-предшественниц кардиомиоцитов считается перспективным подходом в лечении пациентов, перенесших инфаркт миокарда, однако исследования в этой области пока ограничиваются доклиническими экспериментами на животных. В течение последних двух лет были опубликованы работы, в которых сообщается о создании жизнеспособных эквивалентов миокарда человека на основе кардиомиоцитов, полученных из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека. Кардиомиоциты вводили в сердечную мышцу экспериментальных животных с индуцированным инфарктом миокарда. Тем не менее, образовавшиеся *in vivo* фрагменты миокарда состояли из малого количества клеток, большая часть которых со временем гибла [1-3]. Предварительное помещение трансплантируемых клеток на обеспечивающие их адгезию трехмерные матриксы увеличивает

срок жизни и возможные размеры трансплантата [4, 5]. Однако, у подобных тканеинженерных конструкций есть другие недостатки, связанные с недостаточной биосовместимостью, неоптимальными механическими и другими характеристиками различных матриксов.

В 2008 г. научная группа под руководством С. Murray предложила новый подход к созданию макроскопических тканеинженерных конструкций, предназначенных для восстановления сердечной мышцы после ее повреждения [6]. Фрагменты сердечной ткани были получены из высокоочищенных кардиомиоцитов, индуцированных из ЭСК человека. Клетки центрифугировали и формировали плотный конгломерат, который затем трансплантировали под перикард реципиенту. Со временем, однако, из-за недостатка питания в трансплантате неизбежно развивался некроз, распространявшийся от его центра к периферии. В 2009 г. эта же группа исследователей

сообщила об улучшении разработанного подхода и создании васкуляризованных фрагментов сердечной мышцы, благодаря чему удается решить проблему центрального некроза.

Исследователи провели несколько параллельных экспериментов, в которых трансплантировали иммунодефицитным мышам конгломераты клеток, содержавшие:

– кардиомиоциты, полученные из ЭСК человека (в количестве $3 \cdot 10^6$);

– кардиомиоциты, полученные из ЭСК человека (в количестве $3 \cdot 10^6$), и эндотелиальные клетки, выделенные из пуповинной вены человека, в соотношении 1:1;

– кардиомиоциты, полученные из ЭСК человека (в количестве $3 \cdot 10^6$), эндотелиальные клетки, выделенные из пуповинной вены человека, и эмбриональные дермальные фибробласты мыши, в соотношении 1:1:0,5;

– кардиомиоциты, полученные из ЭСК человека (в количестве $3 \cdot 10^6$), эндотелиальные клетки, выделенные из пуповинной вены человека, и фетальные дермальные фибробласты человека, в соотношении 1:1:0,5.

Клеточные конгломераты трансплантировали под перикард, и через 1 нед. после операции оценивали их приживаемость, а также проводили гистологический и иммуногистохимический анализ образовавшейся ткани.

Было вновь подтверждено, что трансплантаты, состоящие только из кардиомиоцитов, быстро резорбируются *in vivo* и не формируют жизнеспособных структур в сердце реципиента. Добавление в исходные клеточные конгломераты эндотелиальных клеток пуповинной вены также не влияло на полученный результат, не приводя к развитию в трансплантате капиллярной сети. Добавление же к двухкомпонентным клеточным конгломератам эмбриональных фибробластов мыши либо человека приводило к тому, что в обоих случаях в трансплантате формировалась капиллярная сеть. Все фрагменты сердечной ткани, полученные в экспериментах, были способны к ритмичным сокращениям под действием электрической стимуляции *in vitro*, однако трехкомпонентные трансплантаты обладали в 3–4 раза более высокой механической прочностью в сравнении с одно- и двухкомпонентными, тем не менее, не обладая механическими характеристиками нормальной сердечной ткани. По-видимому, увеличение механической прочности было связано с синтезом коллагена фибробластами – в трансплантате между кардиомиоцитами обнаруживались тонкие волокна соединительной ткани.

In vivo трехкомпонентные клеточные конгломераты формировали фрагменты сердечной мышцы, в 10 раз

превосходившие по размерам фрагменты ткани, образовавшиеся из одно- и двухкомпонентных конгломератов. Более того, образовавшиеся в них капилляры анастомозировали с капиллярами сердца животного-реципиента, что было подтверждено обнаружением в капиллярах, имевших выстилку из эндотелиоцитов человека, форменных элементов крови мыши.

Эмбриональные фибробласты, содержащиеся в трехкомпонентных трансплантатах, обеспечивали выживание и пролиферацию кардиомиоцитов и эндотелиоцитов не только благодаря синтезу паракринных факторов, но и прямым межклеточным контактам. Добавление в исходный клеточный конгломерат кондиционированной культуральной среды, в которой выращивали эмбриональные фибробласты, не оказывал значимых эффектов на свойства одно- и двухкомпонентных трансплантатов. Авторы работы указывают на то, что эмбриональные фибробласты по своим характеристикам очень близки к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (ММСК), содержащимся в костном мозге взрослых млекопитающих и, по-видимому, следующим шагом в разработке «безматричных» тканеинженерных конструкций должно стать использование именно этого типа клеток вместо эмбриональных фибробластов.

Несмотря на то, что в описанной работе проведен исчерпывающий анализ полученных тканеинженерных структур, остается решить ряд фундаментальных и практических вопросов, прежде чем можно будет говорить о потенциальной применимости данной методики в клинике. Все полученные фрагменты ткани были способны сокращаться в ритме здорового сердца человека (около 70 сокращений в мин). Однако этого факта, приведенного авторами работы в качестве доказательства принципиальной возможности использования трансплантатов в терапии пациентов с перенесенным инфарктом, недостаточно для подобного вывода. На данный момент не ясно, какого эффекта следует ожидать от трансплантации тканеинженерных фрагментов сердечной мышцы в поврежденный миокард, поскольку трансплантация проводилась только в интактную ткань. Микроокружение в зоне повреждения значительно отличается от такового в здоровой ткани, и до проведения соответствующих доклинических испытаний нельзя спрогнозировать приживаемость трансплантатов и их успешную интеграцию в сердечную мышцу реципиента, а, значит, нельзя и сделать уверенного заключения о перспективности описанного интересного подхода.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V. et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 1015–24.
2. Caspi O., Huber I., Kehat I. et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50: 1884–93.
3. Van Laake L.W., Passier R., Monshouwer-Kloots J. et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction.

Stem Cell Res. 2007; 1: 9–24.

4. Simpson D., Liu H., Fan T.H. et al. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells* 2007; 25: 2350–7.

5. Carrier R.L., Papadaki M., Rupnick M. et al. Cardiac tissue engineering: Cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol. Bioeng.* 1999; 64: 580–9.

6. Stevens K.R., Pabon L., Muskheli V., Murry C.E. Scaffold-free human cardiac tissue patch created from embryonic stem cells. *Tissue Eng. Part A* 2008; 15: 1211–22.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Stevens K.R., Kreutziger K.L., Dupras S.K. et al. Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *PNAS* 2009; 106: 16568–73

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Дегенерация фетальных трансплантатов у больных хореей Хантингтона: долгосрочные результаты

Болезнь (хорея) Хантингтона (БГ) представляет собой неизлечимое и фатальное генетическое заболевание нервной системы, причиной которого является увеличение числа CAG повторов в гене хантингина (*huntingtin*) [1]. В результате мутантный белок с длинным полиглутаминовым «хвостом» активно вмешивается во многие внутриклеточные взаимодействия, приводя к дисфункции и гибели нейронов в области полосатого тела (*corpus striatum*), а также в коре головного мозга. Хотя хантингин экспрессируется в организме повсеместно, наиболее чувствительными к патологическим изменениям оказываются так наз. проекционные шиповатые нейроны среднего размера (*medium-sized spiny neurons*), к которым относится около 95% всех нейронов стриатума.

Одна из стратегий лечения БГ заключается в замещении погибших и пораженных стриальных нейронов фетальными трансплантатами [2]. Многочисленные эксперименты с использованием *in vivo* моделей БГ на грызунах и приматах оказались успешными (например, [3–5]), что позволило в конце 1990-х гг. начать клинические испытания на единичных больных. Правда, результаты таких трансплантаций оказались противоречивы. Так, в течение 2–4 лет после трансплантации у пациентов отмечалось относительное улучшение клинических показателей, после чего следовало прогрессивное обострение заболевания [6–8]. Надежду на эффективность такого подхода в будущем давал тот факт, что отростки трансплантированных нейронов были способны формировать контакты с соответствующими нейронами реципиентной ткани, хотя полноценная функциональная интеграция трансплантатов так и не происходила. Тем не менее, жизнеспособные трансплантаты обнаруживались в *corpus striatum* спустя как 1,5 года [9], так и 6 лет [10], и поэтому дальнейшее прогрессирование заболевания связывали с проблемой образования синаптических связей между нейронами трансплантата и реципиента.

Недавно исследовательская группа нейрохирурга Томаса Фримана (Thomas Freeman) из Университета Южной Флориды оценила долгосрочные результаты трансплантации фетальных графтов у трех больных БГ. В июльском номере PNAS авторы сообщают, что спустя 10 лет после операции у пациентов отмечаются выраженные дегенеративные и воспалительные изменения в трансплантатах, что, в совокупности с сомнительными клиническими результатами, ставит под вопрос рациональность проведения дальнейших клинических испытаний.

В качестве материала для трансплантации использовались образцы солидной ткани размером 0,5–1,0 мм³ из дальне-латеральной части выступа бокового желудочка 8–9-недельных эмбрионов. Эмбриональную нервную ткань симметрично трансплантировали в хвостатое ядро (*caudate nucleus*) и скорлупу (*putamen*) *corpus striatum* (5–8 эмбриональных образцов на один трансплантат; общее количество трансплантатов – от 10 до 16). В работе F. Cicchetti с соавт. анализировались ткани головного мозга, полученные при аутопсии трех пациен-

тов, участвовавших в клиническом исследовании [7]. Авторы провели морфологический и гистологический анализ тканей полосатого тела в зонах трансплантации, иммуногистохимическую оценку клеточного состава, в том числе инфильтрацию лимфоцитами, анализ экспрессии мутантного белка хантингина (EM48), а также определение синаптических связей между нейронами трансплантата и окружающих его тканей.

Приживление трансплантатов было отмечено у двух из трех пациентов, при этом графты, трансплантированные в хвостатое ядро, не прижились ни у одного из больных. Более того, у пациентов с прижившимися трансплантатами наблюдалась выраженная (56,5% и 45%) атрофия *putamen*. Число проекционных нейронов в Р-зонах трансплантата (т.е. зонах, содержащих стриальные нейроны) по сравнению с окружающей тканью *corpus striatum* было снижено, а сами клетки несли морфологические признаки дегенерации, не характерные для интернейронов. Кроме того, трансплантированные и реципиентные стриальные нейроны экспрессировали каспазу-3 – один из маркеров апоптотической гибели клеток. Таким образом, дегенерация нейронов в трансплантатах протекала намного интенсивнее, нежели в окружающем их *corpus striatum*.

Почему же трансплантированные здоровые нейроны, вместо того, чтобы способствовать долговременному восстановлению пораженной нервной ткани, сами становятся мишенью прогрессирующего патологического процесса? Иначе говоря, как мутантный белок, локализованный в реципиентных тканях, «переносит» свой деструктивный эффект на трансплантат?

По всей видимости, мутантный хантингин вызывает дегенерацию трансплантированных нейронов опосредованно, поскольку в самом трансплантате экспрессия мутантного гена (EM48⁺) не наблюдается. Авторы полагают, что нейрональная дегенерация индуцируется за счет синтеза аномального белка в других частях *corpus striatum* и/или в иннервирующих его зонах. Действительно, маркер EM48 присутствует в слое V коры головного мозга, откуда полосатое тело иннервируют глутаматергические кортикальные нейроны (кортикастриальные проекции). Кроме того, *corpus striatum* получает сигналы от дофаминергических нейронов *substantia nigra pars compacta* (нигростриальные проекции) [1]. Таким образом изменение иннервации стриатума может привести к гибели трансплантированных нейронов?

Согласно устоявшимся представлениям, один из основных механизмов гибели проекционных нейронов стриатума – так называемое «токсическое возбуждение» (*excitotoxicity*) [1, 11]. Токсическое возбуждение стриальных нейронов возникает в результате избыточного высвобождения глутамата терминалями аксонов, иннервирующих *corpus striatum*, что вызывает чрезмерное повышение концентрации внутриклеточного кальция, повреждение митохондрий, образование реактивных форм кислорода и азота и в итоге гибель клетки. Кроме

того, нейротоксичность глутамата и его аналогов (NMDA, AMPA, каиновой и хинолиновой кислот) может быть связана с повышенной экспрессией и/или сенситизацией глутаматных рецепторов, недостатком ингибирующих ГАМК-ергических сигналов или снижением способности глиальных клеток поглощать избытки высвобожденного из терминалей глутамата. Известно также, что кортико-стриальные проекции обеспечивают нейроны полосатого тела трофическими сигналами, недостаток которых может приводить к апоптозу. Более того, нарушение активности дофаминергического нигростриального пути тоже может приводить к гибели нейронов corpus striatum, вызывая окислительный стресс и повышая концентрацию внутриклеточного кальция.

F. Cicchetti с соавт. обнаружили, что оба афферентных пути могут быть вовлечены в процесс дегенерации трансплантатов. Так, по данным иммуногистохимического анализа, отростки дофаминергических нейронов формируют синаптические контакты с трансплантированными нейронами, а vGlut1⁺ терминали аксонов кортико-стриальных проекций прилежат к проекционным нейронам corpus striatum.

Дополнительный вклад в дегенерацию аллогенных трансплантатов также вносят воспалительные реакции. F. Cicchetti с соавт. обнаружили, что трансплантаты индуцировали воспалительный ответ, о чем свидетельствовали присутствие CD4⁺, CD8⁺ и HLA-DR⁺ лимфоцитов в графтах и воспалительный ответ со стороны глиальных клеток — астроцитов и микроглиоцитов. GFAP⁺ клетки с морфологией реактивных астроцитов располагались вокруг трансплантатов, а непосредственно среди стриальных нейронов трансплантата обнаруживались активированные, фагоцитирующие микроглиальные клетки.

Итак, обнаруженные Т. Фриманом и его коллегами дегенеративные изменения фетальных трансплантатов у больных БГ спустя десять лет после операции, к сожалению, не позволяют рассматривать данную форму трансплантации в качестве перспективного метода лечения хорей Хантингтона. Эти результаты кардинально отличаются от результатов, полученных при аналогичных трансплантациях пациентам с болезнью Паркинсона, у которых улучшение клинической картины наблюдалось на протяжении 11–12 лет [12, 13].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gil J.M., Rego A.C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 2008; 27(11): 2803–20.
2. Dunnett S.B., Rosser A.E. Cell therapy in Huntington's disease. *NeuroRx.* 2004; 1(4): 394–405.
3. Isacson O., Brundin P., Kelly P.A. et al. Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* 1984; 311(5985): 458–60.
4. Pritzel M., Isacson O., Brundin P. et al. Afferent and efferent connections of striatal grafts implanted into the ibotenic acid lesioned neostriatum in adult rats. *Exp. Brain Res.* 1986; 65(1): 112–26.
5. Hantraye P., Riche D., Maziere M., Isacson O. Intrastriatal transplantation of cross-species fetal striatal cells reduces abnormal movements in a primate model of Huntington disease. *PNAS* 1992; 89(9): 4187–91.
6. Freeman T.B., Cicchetti F., Hauser R.A. et al. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *PNAS* 2000; 97(25): 13877–82.
7. Hauser R.A., Sandberg P.R., Freeman T.B., Stoessl A.J. Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *Neurology* 2002; 58(11): 1704.

Низкая жизнеспособность стриальных проекционных нейронов донорской ткани указывает на то, что патологический процесс, схожий с БГ, распространяется в итоге и на аллогенный трансплантат. Как результат, объем поражения corpus striatum в исследованных образцах не отличается от такового у больных БГ, которым трансплантация не проводилась.

Из этого исследования можно сделать несколько выводов. Во-первых, corpus striatum и особенно хвостатое ядро — не лучшая мишень для трансплантации фетальных нейронов. Если патологический процесс начинается вне полосатого тела, то можно полагать, что и терапия должна быть направлена на первичный очаг поражения.

Во-вторых, патогенез БГ таков, что отсутствие мутантного белка — причинного фактора этой патологии — не защищает здоровую ткань трансплантата от деструкции.

В-третьих, следует отметить, что подобные трансплантации также сопряжены со значительным риском для пациентов. Так, у двух больных образовались субдуральные гематомы, что потребовало дополнительного хирургического вмешательства. При этом аналогичные трансплантации пациентам с болезнью Паркинсона, проводившиеся тем же хирургом, прошли успешно.

Наконец, полученные результаты указывают на необходимость разработки и развития альтернативных подходов в терапии БГ, которые направлены на устранение негативных эффектов мутантного хантингтина [14]. В частности, действие новых лекарственных средств может быть направлено: 1) на контроль токсичных для стриальных нейронов сигналов от нигростриальных и кортико-стриальных путей; 2) на повышение жизнеспособности стриальных нейронов за счет обеспечения трофических сигналов, восстановления функции митохондрий и предотвращения апоптотической гибели клеток; 3) на блокирование агрегации хантингтина и усиление его протеолитической деградации. Особое место занимает генная терапия хорей Хантингтона, с помощью которой можно добиться продукции нейротрофических факторов в зоне поражения либо непосредственного ингибирования экспрессии хантингтина с помощью РНК-интерференции. Некоторые из этих лекарств «нового поколения» (преимущественно нейропротекторные агенты — креатин, ненасыщенные жирные кислоты) уже находятся на стадии клинических испытаний [15].

8. Bachoud-Livi A.C., Gaura V., Brugières P. et al. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol.* 2006; 5(4): 303–9.

9. Freeman T.B., Cicchetti F., Hauser R.A. et al. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *PNAS* 2000; 97(25): 13877–82.

10. Keene C.D., Sonnen J.A., Swanson P.D. et al. Neural transplantation in Huntington disease: long-term grafts in two patients. *Neurology* 2007; 68(24): 2093–8.

11. Cepeda C., Wu N., Andry V.M. et al. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 2007; 81(5–6): 253–71.

12. Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A. et al. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* 2008; 14(5): 504–6.

13. Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A. et al. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov. Disord.* 2008; 23(16): 2303–6.

14. Martin B., Golden E., Keselman A. et al. Therapeutic perspectives for the treatment of Huntington's disease: treating the whole body. *Histol. Histopathol.* 2008; 23(2): 237–50.

15. Fulmer T. Low-Rhes approach to Huntington's. *SciBX* 2009; 2(25).

Подготовил А.В. Леявский

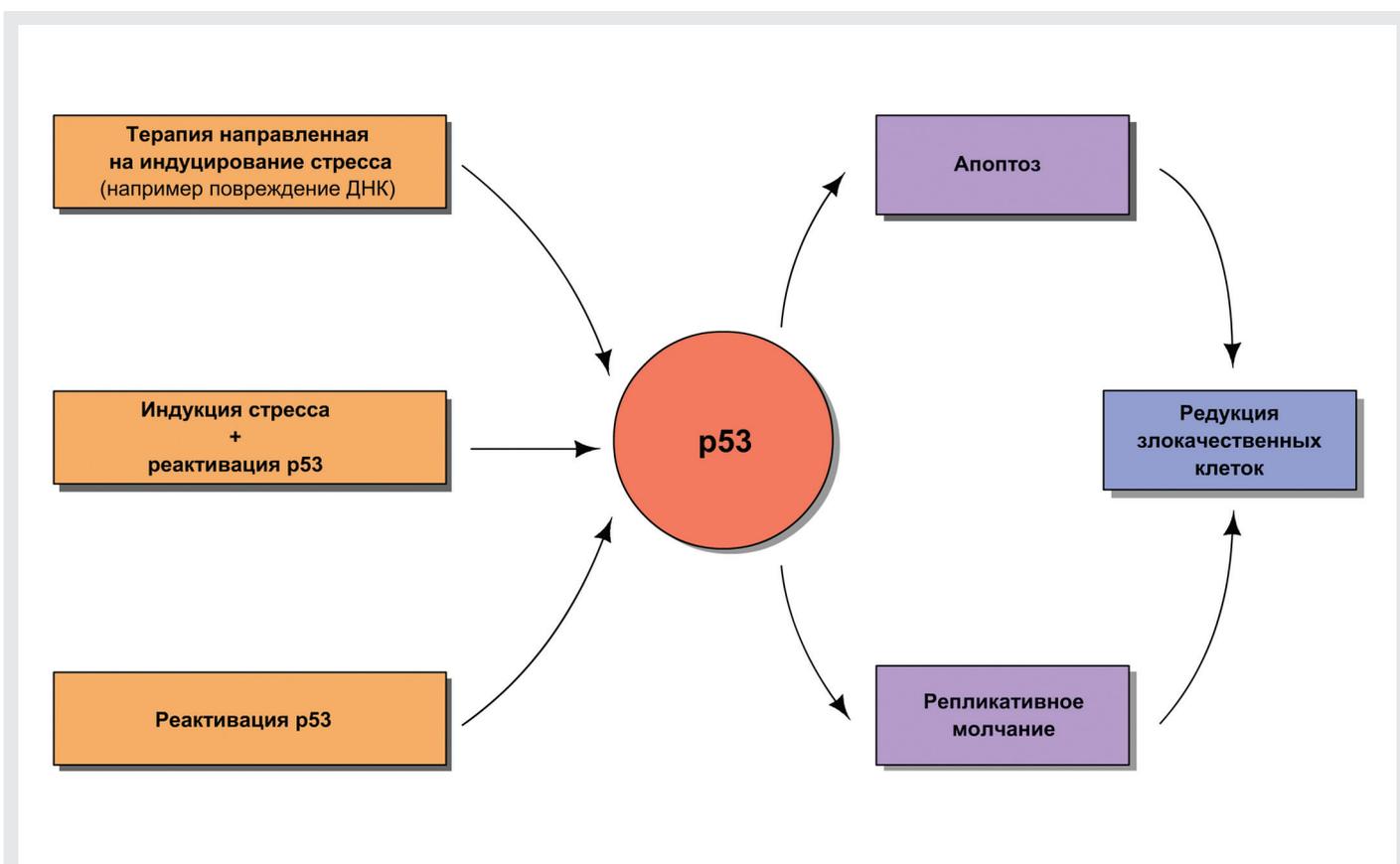
По материалам: Cicchetti F., Saporta S., Hauser R.A. et al. Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration. *PNAS* 2009; 106(30): 12483–8

Успешный опыт генной терапии немелкоклеточного рака легких опухолевым супрессором p53: результаты клинических испытаний

Рак легких – одна из ведущих причин смертности от онкологических заболеваний, а на долю немелкоклеточного рака легких приходится в среднем от 75 до 80% всех случаев рака легких в мире [1, 2]. Пятилетняя выживаемость больных с данной патологией составляет около 50%, и до настоящего времени не разработано терапевтического подхода, который смог бы увеличить этот срок. Хирургический метод лечения, а также радио- и химиотерапия оказываются при немелкоклеточном раке легких низкоэффективными [3]. В последние годы исследователи и клиницисты возлагают большие надежды на принципиально новый подход к борьбе с онкологическими заболеваниями – генную терапию. К настоящему времени уже получен ряд многообещающих результатов генной терапии в доклинических и клинических испытаниях [4–6]. К началу 2005 г. в мире было проведено более 600 клинических испытаний применения генной терапии в лечении онкологических больных

[7]. В числе агентов генной терапии выступали вирусные векторы, несущие ген опухолевого супрессора p53 (rAd-p53). В этих клинических испытаниях была продемонстрирована безопасность использования rAd-p53 как в качестве единственного терапевтического агента, так и в сочетании с традиционной химиотерапией, однако эффективность данного подхода однозначно доказана не была [8–11]. В 2003 г. препарат rAd-p53 (коммерческое название – Gendicine®) был разрешен Министерством Здравоохранения Китая для применения при плоскоклеточном раке кожи [12].

Недавно научной группой из Китая была опубликована статья, в которой представлены результаты безопасности и эффективности применения rAd-p53 при немелкоклеточном раке легких в нерандомизированном двухцентровом клиническом испытании. В испытание вошло 58 пациентов с диагнозом «немелкоклеточный плоскоклеточный рак легкого III и IV стадии». Мутация в



Общая схема лечения злокачественных новообразований с помощью p53. p53 играет ключевую роль в реакции клеток на стресс, включая повреждения ДНК. При клеточном стрессе p53 стабилизируется и регулирует экспрессию, локализацию и активность генов, продукты которых участвуют в процессах репарации ДНК, блокировки клеточного цикла, репликативного молчания и апоптоза. Исследования на разных моделях показали, что реактивация активности p53 в опухолевых клетках, индукция стресса или комбинация этих методов могут значительно увеличить эффективность лечения злокачественных новообразований.
По А. Vazquez et al. 2008

гене белка-супрессора опухолевого роста p53 не была обязательным критерием включения, поскольку ранее в работах *in vitro* было показано, что внесение в клетку экзогенного гена p53 независимо от работы эндогенного p53 усиливало апоптоз злокачественных клеток [5,6]. Следует заметить, что мутация гена p53, чей продукт ответствен за остановку клеточного цикла, клеточное старение и индукцию апоптоза, обнаруживается в большинстве злокачественных опухолей человека и в 50% раков легких: мутантный белок нефункционален, в связи с чем злокачественные клетки не претерпевают нормального клеточного старения и не подвержены апоптотической гибели [8,13,14]. Пациенты, ранее получавшие химио- или радиотерапию, а также пациенты, чья ожидаемая продолжительность жизни составляла менее 3 мес., в исследование включены не были.

Контрольная группа пациентов (39 человек) получала стандартную инфузионную терапию комбинацией противоопухолевых препаратов флуорацила, навелбина и цисплатина, в то время как остальные 19 человек получали помимо инфузионной терапии также местные (непосредственно в опухолевые узлы) либо интраартериальные инъекции гAd-p53. Инъекции гAd-p53 (количество вирусных частиц в одной инъекции колебалось от 1 до $4 \cdot 10^{12}$) проводились максимум четырежды, их количество зависело от стадии заболевания, количества и размеров опухолевых узлов. Время наблюдения за состоянием пациентов составило 12 мес., при этом клиницисты оценивали следующие параметры:

- локальный ответ на терапию (изменение размеров опухоли);

- среднее время от начала терапии до прогрессии заболевания. Прогрессией считалось увеличение размеров первичной опухоли на 20%, появление новых вторичных опухолевых узлов в легких, в регионарных лимфатических узлах и в удаленных от первичной опухоли органах в результате метастазирования, плевральная эффузия;

- среднюю выживаемость в группе.

Как в контрольной группе, так и в группе, получавшей сочетанную терапию, не было отмечено развития угрожающих жизни негативных побочных эффектов. Следует отметить, что в контрольной группе общая выраженность негативных побочных эффектов была выше, чем в группе сочетанной терапии. В группе сочетанной терапии практически не было отмечено таких побочных эффектов, как потеря аппетита, тошнота, рвота, боли и лейкопения, в то время как несколько сильнее, чем в контрольной группе, был выражен гриппоподобный синдром, артралгия и миалгия. Наиболее важным эффектом сочетанной терапии можно считать увеличение продолжительности периода до прогрессии заболевания: у пациентов, получавших инъекции гAd-p53, прогрессию заболевания отмечали в среднем через 7,7 мес., в то время как в контрольной группе – через 5,5 мес. от

начала терапии. Уменьшение размеров первичной опухоли на 50% и более наблюдалось по данным компьютерной томографии у 47,3% пациентов из группы сочетанной терапии и у 38,4% пациентов из контрольной группы. Несмотря на это, достоверных отличий в средней выживаемости пациентов из двух групп отмечено не было: через 3, 6 и 12 мес. наблюдения выживаемость составляла соответственно 94,74%, 89,47% и 52,63% в группе сочетанной терапии и 92,31%, 69,23% и 38,83% в контрольной группе.

Результаты этого исследования можно назвать положительными, так как, несмотря на отсутствие увеличения среднего времени жизни больных, было показано достоверное улучшение качества их жизни. Авторы работы не проводили исследований экспрессии вектора в злокачественных клетках, сославшись на результаты более ранних исследований, показавших, что внесение экзогенного p53 приводит к индукции экспрессии других генов-супрессоров опухолевого роста, таких как MDM2, p21 и BAK [11].

Остается неясным, какой из способов доставки данного вектора (местная инъекция либо инфузия в кровоток) является оптимальным. С другой стороны, в некоторых случаях местная инъекция может оказаться технически невозможной, например, из-за малого размера и диффузного расположения опухолевых узлов, несмотря на то, что теоретически именно местная инъекция должна обеспечивать наиболее эффективную доставку вектора в опухолевые клетки, поскольку при системной доставке он может подвергаться иммунной атаке и деградации [15]. В данном исследовании существенных различий исследованных параметров в зависимости от способа доставки вектора выявлено не было, что указывает на потенциальную возможность доставки данного терапевтического агента через кровоток. Интересно отметить, что применение гAd-p53 снижало выраженность негативных побочных эффектов инфузионной терапии противоопухолевыми препаратами.

Данное исследование является предварительным, и для подтверждения полученных положительных результатов необходимо проведение расширенных мультицентровых клинических испытаний препарата Gendicine®. В исследовании Y.-S. Guan и соавт. вошло небольшое количество пациентов, при этом размеры контрольной группы и группы сочетанной терапии существенно различались. Группа сочетанной терапии оказалась примерно в 2 раза меньше контрольной, из-за чего, возможно, по некоторым параметрам результаты в ней оказались более однородными, в то время как относительно продолжительности жизни больных не было выявлено статистически достоверной разницы за счет широкого разброса данных. Для уверенного вывода об эффективности генной терапии с помощью гAd-p53 необходим более длительный период наблюдения за состоянием пациентов, по крайней мере, в течение 5 лет.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Parker S.L., Tong T., Bolden S., Wingo P.A. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J. Clin.* 1997; 47(1): 5–27.
2. Frasci G., Panza N., Comella G., Pcellio G. Is there any impact of new drugs on the outcome of advanced NSCLC? An overview of the Southern Italy Cooperative Oncology Group trials. *Oncologist* 1999; 4(5): 379–85.
3. Daniel J.C., Smythe W.R. Gene therapy of lung cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 2003; 21(3): 196–204.
4. Osaki S., Nakanishi Y., Takayama K. et al. Alteration of drug chemosensitivity caused by the adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene in human lung cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2000; 7(2): 300–7.

5. Inoue A., Natumi K., Matsubara N. et al. Administration of wild-type p53 adenoviral vector synergistically enhances the cytotoxicity of anti-cancer drugs in human lung cancer cells irrespective of the status of p53 gene. *Cancer Lett.* 2000; 157(1): 105–12.

6. Kawabe S., Munshi A., Zumstein L.A. et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells but not normal lung fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001; 77(2): 185–94.

7. <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

8. Junker K., Wiethage T., Muller K.M., Thomas M. p53 tumour-suppressor gene in non-small-cell lung cancer with neoadjuvant therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001; 126(4): 238–45.

9. Schuler M., Herrmann R., de Greve J.L. et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19(6): 1750–8.

10. Nishizaki M., Meyn R.E., Levy L.B. et al. Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutic in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7(9): 2887–97.

11. Swisher S.G., Roth J.A., Komaki R. et al. 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(1): 93–101.

12. Peng Z. Current status of gencidine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum. Gene. Ther.* 2005; 16(9): 1016–27.

13. Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S. et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(17): 3551–5.

14. Takahashi T., Nau M.M., Chiba I. et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246(4929): 491–9.

15. Moon C., Oh Y., Roth J.A. Current status of gene therapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(14): 5055–67.

Подготовила А.С. Григорян

Guan Y-S., Liu Y., Zou Q. et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with bronchial arterial infusion for treatment of advanced non-small-cell lung cancer, one year follow-up. *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* 2009; 10 (5): 331–40

Система для проведения экстракорпорального фотофереза – UVAR XTS («Therakos», США)

Экстракорпоральный фотоферез представляет собой метод, основанный на сочетании лейкофереза и облучения лейкоцитов, предварительно обработанных фотосенсибилизатором (8-метоксипсораленом), ультрафиолетовым светом диапазона А (320 – 400 нм).

Область применения:

Лечение онкологических, аутоиммунных, дерматологических и пролиферативных заболеваний:

- Т-клеточная злокачественная лимфома кожи,
- атопический дерматит,
- склеродермия,
- псориаз,
- ревматоидный артрит,
- отторжение органов после
- уменьшение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).

Особенности системы:

Безопасность для пациента:

- одноразовая система расходных материалов,
- исключение риска воздушной эмболии,
- исключение риска заражения,
- осуществление контроля поступления антикоагулянта,
- контроль давления в системе,
- контроль скорости забора и возвращения крови пациенту,
- возможность изменения параметров процесса в течение процедуры,
- при необходимости автоматическая блокировка системы магистралей.

Простота в работе и обслуживании:

- удобное использование для оператора,
- конструкция аппарата и расходных материалов исключают возможность ошибки при загрузке,
- однократная вентуляция,
- полная автоматизация процедуры,
- быстрое и безопасное извлечение компонентов процедурного набора после завершения процедуры,
- наличие ключа данных, на котором фиксируется вся информация о протекании процесса.



Система для выделения стволовых клеток – Sерах («BioSafe», Швейцария)

- Самая современная, компактная система, позволяющая выделять стволовые клетки из пуповинной и периферической крови, а также из костного мозга.
- Идеальная система для быстрой автоматической обработки крови с высоким уровнем жизнеспособности клеток после процедуры.
- Sерах позволяет проводить обработку крови в рамках 8 протоколов.
- Принцип действия Sерах основан на сепарации центрифугированием, позволяющем разделять компоненты крови в соответствии с их плотностью и размерами.
- Система предназначена для применения в клеточной терапии, где необходимо получение определенных компонентов крови.
- Обработка крови или ее компонентов происходит в закрытой стерильной системе.
- Компоненты крови собираются в стандартные мешки и готовы для дальнейшего использования (криоконсервация, наращивание in vitro, переливание пациенту и др.).

Эксклюзивный представитель ООО «Инновационные Медицинские Технологии»
Москва, ул. Ивана Франко, д. 4, корп. 15, тел/факс: +7(495)380-36-62
E-mail:

dr_fedorov@haemoline.ru , gerasimenkovd@haemoline.ru, neunlyovamy@delrus.org



Therakos
Immune Cell Therapy

Автоматизированная система для хранения стволовых клеток в жидком азоте – BioArchive («Thermogenesis», США).

Система рассчитана на 3626 образцов стволовых клеток

- Низкая стоимость операционного процесса
- Низкий расход жидкого азота на один образец во время хранения и программного замораживания
- Полностью автоматизированный процесс сокращает время работы персонала
- Снижение затрат на оборудование
- Не требуется большого количества дьюаров для хранения (одна система BioArchive заменяет 6-7 дьюаров)
- Наличие двух встроенных программных замораживателей
- Безопасность и защита
- Полузакрытая система сокращает воздействие азота на оператора
- Источник бесперебойного питания позволяет разместить/извлечь образец в случае отключения электричества
- Параметры 24-х часового контроля и управления доступом включают в себя: Мониторинг уровня жидкого азота
Пароль для доступа



thermogenesis

Интегрированный программный замораживатель

- Минимизирует температурные колебания
- Отсутствует этап ручного переноса образца из программного замораживателя в дьюар для хранения

Криоконтейнер на 25 мл

- Постоянный геометрический размер образца
- Воспроизводимый процесс заморозки для каждой единицы
- Возможность роботизированной закладки на хранение и извлечение образцов
- Снижается вероятность ошибки, связанной с человеческим фактором

Система управления образцом

- Использование штрих-кода исключает ошибки при перемещении образца
- Отчет по образцу:
История образца
Инвентаризация
График замораживания

www.thermogenesis.ru

Расходные материалы для культивирования стволовых клеток «CellGro» (Германия):

Комплекты CellGro для культивирования клеток в закрытых системах.

- CellGro HPC для культивирования гемопоэтических клеток, NK-клеток, Т-клеток
- CellGro DC для культивирования дендритных клеток
- Бессывороточные среды CellGro:**
- SCGM для культивирования гемопоэтических прогениторных клеток, NK-клеток, Т-клеток
- DC для культивирования дендритных клеток

Культуральные мешки VueLife

- (сделаны из FEP Teflon)
- CellGro цитокины**
- Для увеличения гемопоэтических прогениторных клеток, NK-клеток, Т-клеток и дендритных клеток.



Вся продукция зарегистрирована и сертифицирована в России