

НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Экспрессия фактора Oct4 не требуется для самообновления соматических стволовых клеток

Транскрипционный фактор Oct4 является наиболее изученным регулятором самообновления стволовых клеток. Он экспрессируется в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты (ЭСК), где совместно с транскрипционными кофакторами Nanog и Sox-2 отвечает за супрессию дифференцировки клеток, защиту их от апоптоза и стимуляцию пролиферации [1]. При индукции дифференцировки ЭСК locus Oct4 претерпевает серию эпигенетических изменений, приводящих к его репрессии [2]. Вместе с тем Oct4 экспрессируется в ряде клеток-предшественниц различных тканей взрослого организма, где, по-видимому, выполняет те же функции, что и в ЭСК [3, 4]. Выявлена экспрессия Oct4 в мезенхимных стромальных клетках костного мозга (ММСК) и гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) [5], а также в клетках некоторых опухолей [6, 7].

Экспрессия Oct4 как в злокачественных, так и в недифференцированных клетках нормальных тканей позволяет предположить, что Oct4 не только играет ключевую роль в поддержании плюрипотентности ЭСК, но и отвечает за самообновление и защиту от апоптоза соматических стволовых и опухоль-инициирующих клеток. Чтобы проверить эту гипотезу, исследователи из группы C.J. Lengner провели серию экспериментов по тканеспецифичной супрессии фактора Oct4. Были получены несколько линий мышей с делецией Oct4 в различных типах клеток: энтероцитах, ММСК, ГСК, гепатоцитах, клетках-предшественниках нейронов и глии, эпителии волосных фолликулов. После этого авторы сравнили характеристики Oct4⁻ популяций с популяциями дикого типа (Oct4⁺).

Для всех указанных типов клеток было показано, что фактор Oct4 не является необходимым для самообновления их популяций и поддержания тканевого гомеостаза, то есть способности клеток к физиологической и посттравматической регенерации ткани. Иммуногистохимическое исследование образцов Oct4⁻ кишечного эпителия выявило нормальное распределение пролиферирующих клеток в криптах. Для ММСК было показано, что отсутствие экспрессии Oct4 никак не влияет на динамику их пролиферации и на их способность дифференцироваться в клетки мезенхимального ряда. Мутантные по Oct4 ГСК при трансплантации

их животным, подвергшимся сублетальному радиационному облучению, были способны полностью восстанавливать кроветворение. Для проверки регенерационного потенциала Oct4⁻ гепатоцитов авторы произвели резекцию 75% ткани печени, однако восстановление органа заняло 2 месяца, как и в контрольной группе. Животные с делецией Oct4 в нервной ткани также не демонстрировали никаких нарушений двигательной активности и поведения (период наблюдения за ними составлял один год). Не повлияло отсутствие Oct4 и на функции эпителия волосных фолликулов.

Проведя весьма тщательное и детальное исследование, включившее эксперименты как *in vitro*, так и *in vivo*, авторы работы смогли сформулировать обоснованную гипотезу о том, какую роль играет экспрессия Oct4 в стволовых клетках взрослого организма. Они отмечают, что экспрессия данного фактора в соматических клетках невысока. Более того, при помощи метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) она определяется только после 30–40 циклов амплификации кДНК, что может быть следствием присутствия в геноме млекопитающих нескольких Oct4-псевдогенов. Высока вероятность, что Oct4, выявляющийся в клетках-предшественниках тканей взрослого организма, неактивен. Авторы не определяли эффектов делеции Oct4 в клетках опухолей, но предполагают, что в злокачественных новообразованиях Oct4 также не играет ключевой роли в стимуляции пролиферации и защите клеток от апоптоза.

Авторы делают вывод о том, что транскрипционный фактор Oct4, экспрессирующийся на низком уровне в соматических клетках-предшественниках, не играет роли в поддержании их пролиферации и тканевого гомеостаза, как это характерно для ЭСК. Он также не играет роли при канцерогенезе, когда опухоли формируются из соматических клеток. Следует отметить, что всё же существует три типа опухолей, при которых достоверно повышена экспрессия активного Oct4, однако это связано с геномными перестройками, приводящими к перемещению локуса Oct4 под контроль активных промоторов, но не с реактивацией регуляторных элементов гена Oct4, задействованных в ЭСК [8]. Таким образом, экспрессию Oct4 в соматических стволовых клетках можно назвать рудиментом экспрессии эмбрионального генома.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947–56.
2. Feldman N., Gerson A., Fang J. et al. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 188–94.
3. Moriscot C., De Fraipont F., Richard M.J. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the

endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation *in vitro*. *Stem Cells* 2005; 23: 594–603.

4. Morris R.J., Liu Y., Marles L. et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 411–7.

5. Pallante B.A., Duignan I., Okin D. et al. Bone marrow Oct3/4⁺ cells differentiate into cardiac myocytes via age-dependent paracrine mechanisms. *Circ. Res.* 2007; 100: e1–e11.

6. Ngan K.W., Jung S.M., Lee L.Y. et al. Immunohistochemical expression of OCT4 in primary central nervous system germ cell tumours. *J. Clin. Neurosci.* 2008; 15: 149–52.

7. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Trosko J.E., Chang C.C., Kiupel M. Expression of the embryonic transcription factor Oct4 in canine neoplasms: a

potential marker for stem cell subpopulations in neoplasia. *Vet. Pathol.* 2007; 44(6): 893–900.

8. Yamaguchi S., Yamazaki Y., Ishikawa Y. et al. EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43: 217–22.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K. et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 403–15

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

В настоящее время активно ведутся исследования в области получения плюрипотентных соматических клеток животных и человека. Принципиально описаны два пути, посредством которых это может быть достигнуто: использование методов клонирования (например, клеточного слияния, переноса ядер соматических клеток в овоцит второго деления мейоза (somatic cell nuclear transfer, SCNT)) [1–3] и индукция репрограммирования с получением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPS cells), сходных с ЭСК [4–7]. К настоящему времени уже получены iPS клетки мышей [7], а методом SCNT клонирован целый ряд животных от грызунов до приматов [1–3]. Предпринимались попытки получения плюрипотентных клеток, сходных с ЭСК человека, посредством слияния соматических и эмбриональных клеток. Однако данная методика приводила к формированию популяций тетраплоидных гибридных клеток, свойства которых не в полной мере соответствовали стандартным характеристикам ЭСК [8].

Концентрирование интересов клеточных технологов вокруг исследований, связанных с выделением совместимых плюрипотентных клеток, обусловлено возможностью использования их в моделировании и изучении заболеваний человека, открытии, тестировании и совершенствовании лекарственных препаратов, биологически активных веществ, а также для терапевтического применения при большом спектре заболеваний [5].

Одновременно 20 ноября 2007 года S. Yamanaka и J.A. Thomson в on-line версиях журналов Cell и Science, соответственно, опубликовали материалы исследований по получению iPS клеток человека. В этих работах индукцию плюрипотентности производили на разных клеточных культурах и сравнивали полученные клетки между собой и с контролем – ЭСК человека. S. Yamanaka использовал взрослые дермальные фибробласты, веретеновидные синовиоциты и неонатальные фибробласты крайней плоти, а J.A. Thomson – фетальные и неонатальные фибробласты.

Схема репрограммирования предполагает внедрение в клетки исходной культуры дифференцированных клеток генов плюрипотентности, сверхэкспрессия которых призвана вернуть дифференцированную клеточную популяцию к плюрипотентному состоянию. В качестве индукторов репрограммирования K. Takahashi и S. Yamanaka в 2006 году предложили квартет транскрипционных факторов, выявленных ими из 24 претендентов: Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 [7], который и был использован ими в описываемой работе. Oct4 и Sox2 являются ключевыми факторами регуляции пролиферации и плюрипотентности стволовых клеток и характеризуются

высоким уровнем экспрессии в ЭСК, снижающимся в процессе дифференцировки [9]. Вовлечение Klf4 и c-Myc в процессы репрограммирования может быть связано с их ролью в качестве модификаторов хроматина, способствующих активации Oct4 и Sox2. В свою очередь, J.A. Thomson с коллегами на начальном этапе исследования выбирали гены, необходимые для инициации репрограммирования, из 14 кандидатов. В результате была осуществлена замена Klf4 и c-Myc, входящих в стандартный набор транскрипционных факторов «стволовости», на Nanog и Lin28. Роль Nanog, наряду с Oct4 и Sox2, общепризнанна в индукции плюрипотентности соматических клеток [9, 11], тогда как существенная значимость Lin28 в репрограммировании подтверждена не была. Однако необходимость замены c-Myc представляется вполне целесообразной. Выявлена его негативная роль, заключающаяся в индукции апоптоза ЭСК человека [12], а также стимуляции в 20% случаев опухолевой трансформации iPS клеток мышей при реактивации соответствующей области ретровирусного вектора [13]. Интересно, что в исследовании S. Yamanaka были внесены некоторые изменения в методику индукции плюрипотентности, не использованные в работе J.A. Thomson. В частности, были предприняты мероприятия для повышения эффективности использования пула ретровирусов: фибробласты предварительно трансдуцировались лентивирусными векторами, которые содержали гены мышиных рецепторов для ретровирусов – Slc7a1. Это повысило эффективность дальнейшего введения векторов с Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 на 60%. Кроме того, особенностью работы S. Yamanaka является использование с седьмого дня культивирования среды, обогащенной bFGF, который стимулирует пролиферацию ЭСК человека.

В исследованиях селекция культур iPS клеток проводилась на основании морфологического соответствия ЭСК человека (компактность колоний, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, четкая визуализация ядер). Иммунофенотип полученных клеток в обоих исследованиях соответствует фенотипу ЭСК человека – показана экспрессия SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 и Tra-1-81. Методом ПЦР с обратной транскрипцией продемонстрирован характерный для ЭСК высокий уровень экспрессии эндогенных Oct4 и NANOG. К тому же S. Yamanaka с соавт. оценили экспрессию и других генов-маркеров ЭСК человека – REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4, hTERT, указав на дополнительное соответствие полученных в работе культур.

В исследованиях было показано демитилирование цитозингидроксиметилцитидиновых последовательностей промоторных областей генов NANOG и Oct4 в подтверждение их высокой



функциональной активности, что характерно и для ЭСК человека. В контроле (исходные культуры фибробластов) данные области находились в метилированном состоянии.

Для определения потенциала к дифференцировке iPS клетки культивировали в условиях, необходимых для формирования эмбрионидных тел [14], нейронов и кардиомиоцитов. Положительные результаты были достигнуты обеими научными лабораториями, однако S. Yamanaka привел более подробный спектр иммуноцитохимических и генетических характеристик. В его исследовании клетки характеризовались позитивной реакцией на маркеры, характерные для клеток эктодермального (β III-tubulin, GFAP), мезодермального (α -SMA, desmin,) и энтодермального (AFP) происхождения. Методом ПЦР с обратной транскрипцией выявлена экспрессия эктодермальных (MAP2, PAX6), энтодермальных (box A2, cytokeratin 8, 18, SOX17) и мезодермальных (MSX1, BRACHYURY) генов. Экспрессия маркеров нейронов (β III-tubulin, AADC, LMX1B, тирозингидролаза, холинацетилтрансфераза) и кардиомиоцитов (TnTc, MEFC2, MYL2A, MYHCB, NKX2.5) была обнаружена у дифференцированных производных всех колоний iPS клеток. J.A. Thomson с соавт., также отмечая способность iPS клеток к дифференцировке в различных направлениях, подробного описания результатов иммуноцитохимического и генетического анализов не привёл.

Для подтверждения полипотентного статуса в исследова-

ниях выполнялась подкожная трансплантация iPS клеток. В местах инъекций развивались «тератомы», состоящие из всех трех зародышевых листков. Однако J.A. Thomson указывает на неоднородность дифференцировочных потенциалов среди исследуемых культур. В частности, в «тератомах» в 50% случаев отсутствовал нейрональный компонент, также не наблюдалась экспрессия LIN28 в четверти колоний репрограммированных как фетальных, так и неонатальных фибробластов.

Несмотря на ряд различий в материалах, методиках и обоснованиях полученных данных, глобальным результатом исследований двух независимых групп ученых явилось получение iPS клеток человека, сходных по морфологическим, иммуногистохимическим и генетическим критериям с ЭСК человека. Это является первым значительным достижением в области получения аутогенных плюрипотентных клеток путем репрограммирования соматических клеток человека. По мнению редакции журнала Science получение iPS-клеток человека является вторым из наиболее значимых научных открытий 2007 года [15]. На получении и исследовании iPS-клеток сосредотачивается внимание уже нескольких ведущих лабораторий мира. К исследовательским группам, возглавляемые S. Yamanaka, R. Jaenisch и A. Thomson, присоединилась группа G. Daley, чья статья об успешном получении iPS-клеток человека вышла в декабре в on-line версии журнала Nature [16].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wakayama T., Perry A., Zuccotti M. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–74.
2. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64–6.
3. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450 (7169): 497–502.
4. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448 (7151): 260–2.
5. Takahashi K., Yamanaka S., Tanabe K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131 (5): 861–72.
6. Yu J., Vodyanik M.A., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318 (5858): 1917–20.
7. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.
8. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A. et al. Nuclear reprogramming of somatic

cells after fusion with human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122 (5): 653–4.

9. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947–56.

10. Evans P.M., Zhang W., Chen X. et al. Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(47): 33994–4002.

11. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113: 643–55.

12. Sumi T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N. et al. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene* 2007; 26 (38): 5564–76.

13. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448 (7151): 313–7.

14. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti F. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 2000; 6 (2): 88–95.

15. BREAKTHROUGH OF THE YEAR: The Runners-Up. *Science* 2007; 5858: 1844–1849.

16. Park I.H., Zhao R., West J. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141–6.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Takahashi K., Yamanaka S., Tanabe K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007; 131 (5): 861–72.
Yu J., Vodyanik M.A., Thomson J.A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 2007; 318 (5858): 1917–20

Эпигенетический контроль развития млекопитающих в отсутствие отцовского генома

Партеногенетическое развитие млекопитающих строго ограничено геномным импринтингом [1]. Суть геномного импринтинга состоит в том, что гены, передаваемые потомству от обоих родителей, несут специфический «отпечаток» пола родителя, т. е. отцовские и материнские гены маркированы по-разному. Эти «отпечатки» являются временными и могут быть «стерты». Такой «отпечаток» как правило, обеспечивается с помощью эпигенетической метки (всевозможные эпигенетические модификации ДНК). Потомство получает один набор хромосом с отцовской маркировкой некоторых генов, а другой – с материнской. При образовании у потомка половых клеток прежний «отпечаток» стирается, и эти гены маркируются в соответствии с полом данной особи.

Эпигенетические модификации ДНК, определяющие геномный импринтинг, локализуются в определенных участках хромосом, называемых районами контроля импринтинга. Так, в процессе сперматогенеза метилируются три специфических района, расположенных на 7, 9 и 12 хромосомах [4].

Создание овоцитов, содержащих два гаплоидных материнских генома (один – от незрелого овоцита 1-го порядка до фазы роста, а другой – от зрелого овоцита 2-го порядка) позволяет изучить экспрессию импринтированных генов, которые регулируются материнским паттерном метилирования [2]. При этом геном незрелого овоцита «свободен» от импринтинга, тогда как геном полностью сформировавшегося

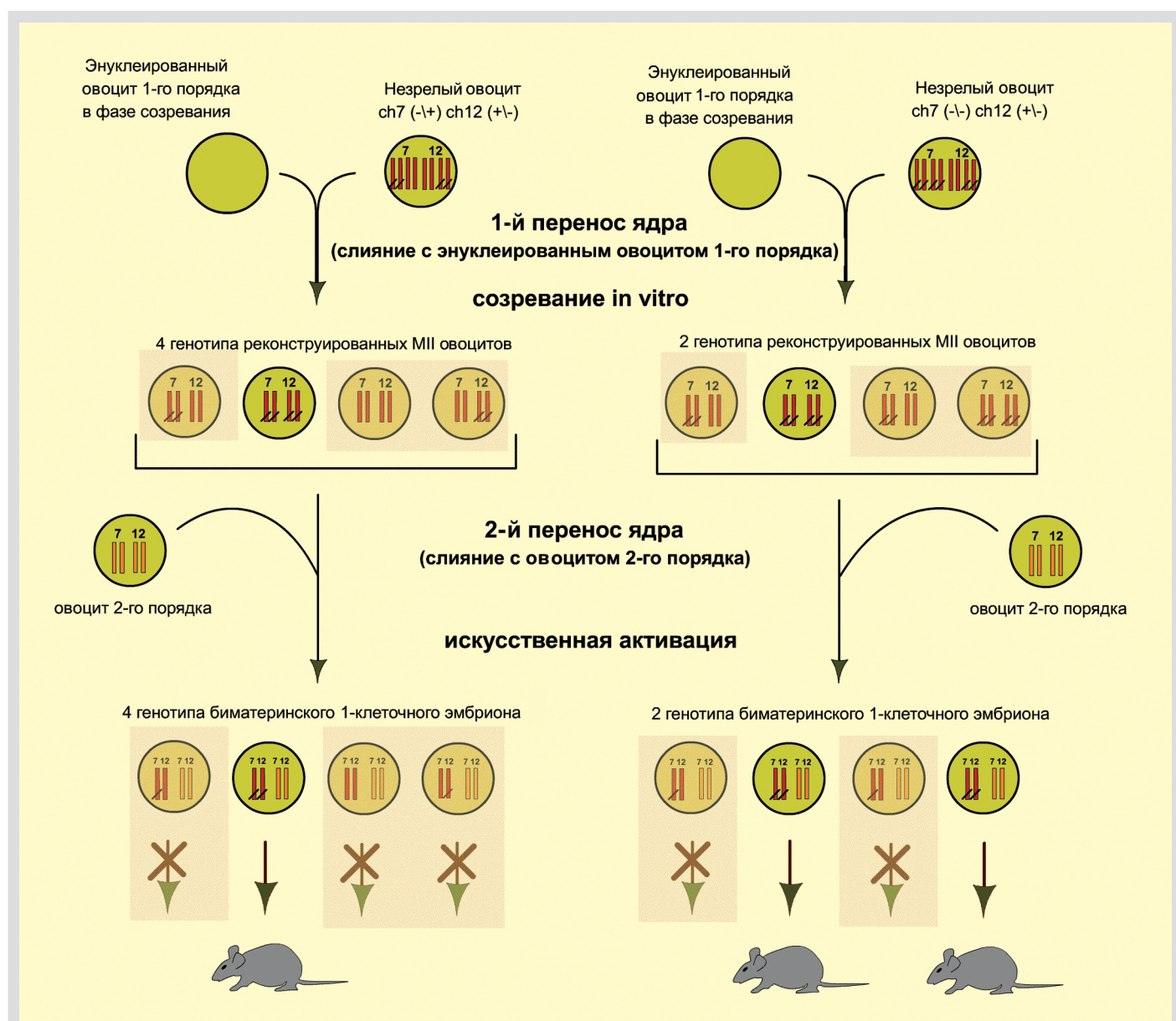


Схема получения биматеринских эмбрионов мыши

овоцита характеризуется импринтингом по типу материнского генома. Изучая эмбрион, полученный от таких двух овоцитов можно проанализировать вклад отцовского генома в развитие зародыша.

Исследовательская группа Т. Кono в 2004 году впервые получила мышей, созданных путем партеногенеза [3]. Они сконструировали биматеринские эмбрионы, используя незрелый овоцит от мышей, несущих делецию гена H19 в районе контроля импринтинга на 7 хромосоме. Тем не менее, эффективность данного подхода была очень низкой. Было получено лишь две живых биматеринских мыши из 371 сконструированного овоцита.

В новом исследовании, опубликованном в *Nature biotechnology*, японские ученые создали биматеринские эмбрионы с использованием незрелых овоцитов, полученных от мышей, имеющих делеции как в районе гена H19-DMR на 7 хромосоме (ch7+/-, или ch7-/-), так и в Dlk1-Dio3 районе контроля импринтинга на 12 хромосоме (ch+/-) (рис.).

Первую яйцеклетку брали у взрослой мыши на стадии герминативной везикулы, а вторую – у новорожденного животного (1 день после рождения) на стадии диплотены первого мейоза. У зрелой яйцеклетки удаляли ядро и энуклеированный овоцит сливали с незрелой яйцеклеткой с помощью вируса, а веретено деления полученной реконструированной клетки было вторично перенесено в оволировавший овоцит («серийный перенос ядра»).

Способность к развитию у биматеринских зародышей была проанализирована с помощью 3D культивирования 323 реконструированных овоцитов и трансплантации 286 полученных в итоге бластоцист в 29 самок. На сроке беременности 19,5 дней авторам удалось получить 42 живых мыши. Все они были гетерозиготны по двойным мутациям на 7 и 12 хромосомах, доказывая тот факт, что мыши лишь с таким геномом выживали в эксперименте.

27 мышей достигли взрослого возраста, а их вес не отличался от веса мышей дикого типа. У 11 мышей наблюдалась значительная задержка развития и они погибли через

3 дня. Общий уровень выживаемости таким образом составил 39,4%, что соответствует показателям выживаемости после ЭКО [5]. Авторы работы связывают задержку в развитии с подавлением транскрипции гена Rasgrf1 (расположенного на 9-й хромосоме) которая регулируется метилированием по отцовскому типу и вызывает секрецию гормона роста. Всего в работе приведено несколько параметров, по которым полученных гиногенетических особей сравнивали с нормальными – анатомическое и гистологическое сравнение строения органов и тканей, биохимические тесты крови и сыворотки, кровяного давления, а также тесты на обучаемость. По всем перечисленным показателям полученные мыши не отличались от мышей дикого типа.

Таким образом, в сравнении с предыдущим исследованием авторы добились значительного повышения уровня выживаемости партеногенетических мышей (с 0,5% до 39,4%). Исследователи предполагают, что строгий барьер для партеногенеза обеспечивается независимо материнским и отцовским геномами (а точнее – метилированием этих геномов в определенных областях). При этом импринтинг по материнскому типу является основным барьером на пути к партеногенетическому развитию на стадии имплантации, а отцовский геном отвечает уже за более поздние стадии развития. Причем эта закономерность зависит от того, в каком статусе (метилированном или деметилированном) находятся 7 и 12 хромосомы, которые импринтируются по отцовскому типу. Восстановление регуляции генной экспрессии в двух рассмотренных районах контроля импринтинга необходимо для нормального развития.

Работа дополняет все предыдущие исследования о роли эпигенетических модификаций в отцовском или/и материнском геномах в развитии млекопитающих. Существовало мнение, что для эффективного переноса ядра требуются различные отцовские факторы, например, РНК сперматозоидов [6]. Однако данная работа свидетельствует о том, что отцовские транскрипты, возможно, вообще не являются значимыми для развития особи после слияния гамет.

ЛИТЕРАТУРА:

1. McGrath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984; 37: 179–183.
2. Obata Y., Kaneko-Ishino T., Koide T. et al. Disruption of primary imprinting during oocyte growth leads to the modified expression of imprinted genes during embryogenesis. *Devel.* 1998; 125: 1553–60.
3. Kono T., Obata Y., Wu Q. et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* 2004; 428(6985): 860–4.

4. Lin S.P., Youngson N., Takada S. et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat. Genet.* 2003; 35: 97–102.

5. Kono T., Obata Y., Yoshimizu T. et al. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nat. Genet.* 1996; 13: 91–94.

6. Ostermeier G.C., Miller D., Huntriss J.D. et al. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004; 429: 15.

Подготовила В.С. Мелихова

По материалам: Kawahara M., Wu Q., Takahashi N. et al. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25(9): 1045–50

Роль фактора Nanog в регуляции плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток

Фактор Nanog является гомеодомненным протеином, экспрессирующимся в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) и дифференцирующихся первичных половых клетках [1]. Делеция Nanog приводит к гибели эмбрионов [2], в то время как его конститутивная экспрессия обеспечивает самообновление популяции ЭСК и поддержание их плюрипотентного состояния как *in vivo*, так и *in vitro* [3, 4]. Прекращение экспрессии Nanog считается свидетельством начала дифференцировки ЭСК. При повышении уровня этого белка клетки дольше сохраняют способность к самообновлению и дольше остаются недифференцированными *in vitro* [5].

До настоящего времени подавляющее большинство исследований было связано с выявлением влияния Nanog на дифференцировку и самообновление клеток [6]. Мало известно о том, каким образом профиль экспрессии этого гена связан с процессами эмбрионального развития, как снижение или полное прекращение его экспрессии влияет на закладку зародышевых листков, и жизнеспособны ли Nanog^{-/-} ЭСК. Исследователи из группы I. Chambers в своей работе, результаты которой были опубликованы в журнале Nature, провели несколько серий экспериментов с целью определения биологической роли этого фактора.

Первая серия экспериментов, проведенная *in vitro* на культурах ЭСК мыши, была направлена на определение характера экспрессии Nanog различными клетками в пределах одной популяции. Авторы произвели инсерцию гена зеленого флуоресцентного белка (eGFP) в область AUG кодона гена Nanog, в результате чего экспрессия Nanog приводила к последующей экспрессии GFP. Было показано, что в культуре присутствовали как GFP⁻, так и GFP⁺ клетки, однако авторы не указывают сроков, на которых производился анализ. При этом оба типа клеток экспрессировали маркеры ЭСК Oct4 и SSEA1. При разделении двух популяций с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) и их дальнейшем раздельном культивировании было показано, что практически 100% GFP⁺ клеток могут давать начало GFP⁻-популяциям, но при этом, что особенно интересно, может происходить и обратный процесс, то есть в клетках может происходить реактивация гена Nanog.

Предыдущие исследования предполагали, что индуцированная остановка экспрессии гена Nanog должна приводить к дифференцировке ЭСК [2]. Для проверки этой гипотезы авторы использовали линию трансгенных ЭСК, в которых экспрессия Nanog подавлялась тамоксифеном. Однако при этом не происходило мгновенной активизации процессов дифференцировки клеток. Отдельные дифференцированные клетки появлялись только на 5–7 сутки после обработки клеточной культуры тамоксифеном. Подавление экспрессии Nanog никак не сказывалось на экспрессии протеинов Sox2 и Oct4, а также так называемых транскриптов, ассоциированных с эмбриональными стволовыми клетками, (embryonic stem-cell associated transcripts, ECATs).

При этом клоногенный потенциал Nanog^{-/-} ЭСК отличался от клоногенного потенциала Nanog^{+/+} ЭСК. Nanog^{-/-} клетки формировали гораздо меньшее число колоний, в которых при этом наблюдалось понижение уровня щелочной фосфатазы. Тем не менее, часть колоний характеризовалась повышенной экспрессией этого фермента, и формирование таких колоний зависело от присутствия экзогенного фактора LIF (leukaemia inhibitory factor). Это служит доказательством

того, что плюрипотентность Nanog^{-/-} клеток не вызвана эпигенетическими факторами, так как клетки, вторично индуцированные к плюрипотентности, не способны реагировать на стимуляцию LIF (т.н. эпиЭСК) [7].

Для определения способности Nanog^{-/-} ЭСК к дифференцировке авторы провели трансплантацию этих клеток под капсулу почки иммунодефицитным мышам. Было показано, что Nanog^{-/-} ЭСК формируют «тератомы», в которых присутствуют производные трех зародышевых листков.

Таким образом, делеция фактора Nanog не приводит к утрате самообновления, клоногенности и плюрипотентности у ЭСК. Они также способны *de novo* включаться в развивающийся эмбрион, что было показано с помощью создания химерных морул из Nanog^{-/-} и Nanog^{+/+} клеток. Впоследствии происходило внедрение GFP Nanog^{-/-} клеток в нейроэпителий и ткани печени и мышц взрослых животных. То есть делеция Nanog не влияет и на способность ЭСК давать начало терминально дифференцированным клеткам взрослого организма, что противоречит литературным данным [2].

Однако было показано, что экзогенное подавление экспрессии Nanog приводит к запрету дифференцировки ЭСК в первичные половые клетки. При реактивации Nanog в таких клетках методом гомологичной рекомбинации происходило полное восстановление их потенциала к дифференцировке.

Таким образом, нельзя сказать, что эта работа опровергает данные более ранних исследований. Тем не менее, ее результаты указывают на ошибочность предположений о том, что функционирование Nanog неотделимо от двух других ключевых факторов ЭСК – Sox2 и Oct4 [8]. Действительно, Nanog^{-/-} ЭСК обладают сниженным в сравнении с клетками дикого типа клоногенным потенциалом и в большей степени склонны дифференцироваться в энтодермальном направлении, хотя образуют производные и других зародышевых листков.

Прекращение экспрессии Nanog не служит необходимым и достаточным сигналом к началу дифференцировки клеток. По-видимому, флуктуации его экспрессии регулируют дифференцировочный потенциал клеток, все больше ограничивая его при повышении внутриклеточной концентрации протеина. Зависимость способности к самообновлению популяции от Nanog носит, по предположению авторов, сходный характер. Этим можно объяснить различные степени коммитации ЭСК к дифференцировке в пределах популяции. Повышение экспрессии Nanog также может вернуть уже коммитированные к дифференцировке ЭСК в плюрипотентное состояние [1].

Важно отметить, что в процессе эмбрионального развития Nanog не экспрессируется конститутивно на одном и том же уровне в плюрипотентных клетках эмбриона. Он экспрессируется в клетках бластоцисты, затем уровень его экспрессии падает во время имплантации [1], после чего вновь начинает возрастать в области эпибласта, клетки которого дольше сохраняют характеристики ЭСК [9]. Таким образом, данные работы во многом объясняют функции фактора Nanog, играющего одну из основных ролей в таких процессах, как закладка внутренней клеточной массы бластоцисты и впоследствии зародышевых листков, регуляция плюрипотентности и самоподдержания популяций ЭСК, а также процесс эпигенетического репрограммирования дифференцированных клеток организма в «стволовые», которому уделяется много внимания в современных исследованиях [10].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113: 643–55.
2. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113: 631–42.
3. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947–56.
4. Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L. et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genet.* 2006; 38: 431–40.
5. Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in

collaboration with STAT3. *Cell* 2003; 115: 281–92.

6. Ivanova N., Dobrin R., Lu R. et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006; 442: 533–8.

7. Brons I.G., Smithers L.E., Trotter M.W. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448: 191–5.

8. Chambers I., Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7150–60.

9. Hart A.H., Hartley L., Ibrahim M., Robb L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev. Dyn.* 2004; 230: 187–98.

10. Silva J., Chambers I., Pollard S., Smith A. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature* 2006; 441: 997–1001.

11. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.

Подготовила А.С. Григорян

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

Высвобождение тканевых ниш в костном мозге – новое направление предтрансплантационной подготовки реципиента в гематологии

Эффективность трансплантации стволовых кроветворных клеток (СКК) при терапии ряда гематологических заболеваний, таких как тяжелый комбинированный иммунодефицит, некоторые лимфомы и лейкозы, экспериментально доказана и клинически подтверждена [1, 2]. В настоящее время наиболее оптимальным способом трансплантации СКК считается внутривенная трансфузия [1–3]. Источником клеточного материала является костный мозг HLA-идентичных/неидентичных доноров, из которого удалены дифференцированные клетки гемопоэтического ряда [4].

Существуют две основных проблемы, которые препятствуют достижению оптимальных результатов трансплантации, заключающихся в максимально полной реализации потенций введенных СКК и обеспечении нормального уровня дифференцированных клеток крови. Первая состоит в иммунологическом барьере, проявляющемся реакцией отторжения трансплантата. Данное осложнение не наблюдается при использовании HLA-совместимого клеточного материала, а также не характерно для пациентов с иммунодефицитными состояниями [1]. Другим фактором, ограничивающим эффективность трансплантации, является конкуренция СКК реципиента и донора за размещение в специфических костномозговых нишах, обеспечивающих реализацию потенций к дифференцировке [3, 5].

При введении аллогенных СКК в организм реципиента с тяжелым комбинированным иммунодефицитом без предварительных мероприятий, направленных на увеличение числа свободных ниш, и дополнительное подавление иммунитета, повышение уровня Т- и В-лимфоцитов связано с реализацией лишь 1% введенных клеток [6]. До настоящего времени в клинической практике в качестве предтрансплантационных мероприятий применяются химиотерапия и облучение, что в зависимости от типа заболевания, с одной стороны, обеспечивает либо ликвидацию малигнизированных клеток, либо подавление иммунитета, а с другой – освобождение костномозговых ниш от пула СКК реципиента. Это вызывает ряд

осложнений, проявляющихся в посттрансплантационном периоде (эндокринопатии, гепатопатии, расстройства дыхательной и нервной систем, остеопения) [7]. В этой связи, усилия исследователей направлены на разработку более безопасных подготовительных мероприятий клеточной терапии.

В журнале *Science* I. Weissman с соавт. опубликовали экспериментальные материалы, указывающие на высокую эффективность предварительного освобождения ниш СКК от нативных клеток без осуществления радикальных процедур. Работа проводилась на иммунодефицитных мышах. Исследователи индуцировали миграцию эндогенных СКК из занимаемых ниш посредством блокады их антигена c-kit антителами ACK2. Именно эти моноклональные антитела способствовали наиболее успешному снижению пула недифференцированных гемопоэтических клеток в костном мозге по сравнению с оцененными в работе 2B8, α -Sca1, β -integrin $\alpha 4$, α -ESAM1. C-kit – мембранный рецептор (CD 117), агонистом которого является фактор стволовых клеток (stem cell factor, SCF), регулирующий пролиферацию клеток, их рост, дифференцировку, адгезию и миграцию [8]. Следовательно, образование временного комплекса «c-kit-ACK2» блокирует SCF-зависимые пути внутриклеточной сигнализации, предотвращая экспансию малодифференцированных клеток в строме костного мозга.

Исследователи внутривенно вводили антитела иммунодефицитным и нормальным мышам, часть из которых на 9 день использовали в качестве доноров красного костного мозга для летально облученных животных. Эффективность трансплантации оценивалась посредством установления концентрации гранулоцитов периферической крови, дифференцировавшихся из введенной фракции моноклеаров костного мозга, меченных GFP. Количество специализированных клеток гемопоэтического ряда в этом случае было на 90% ниже, чем при использовании костного мозга мышей, не подвергнутых действию ACK2. Полученные результаты

свидетельствуют о снижении численности СКК костного мозга вследствие использования АСК2.

Трансфузию суспензии недифференцированных гемопоэтических клеток производили спустя неделю после введения антител, что было необходимо для полной элиминации остаточной концентрации АСК2 из организма. Ежедневный контроль титра антител в сыворотке крови позволил исследователям предотвратить возможное действие остаточных АСК2 на вводимые клетки. Возвращение уровня недифференцированных клеток гемопоэтического ряда к нормальной величине, то есть освобождение CD 117 от антител, отмечалось на 23 день после введения АСК2, следовательно, при использовании данных антител создается своеобразное «временное окно», в рамках которого организм наиболее восприимчив к трансплантации.

Авторы предположили, что при освобождении костно-мозговых ниш реципиента химеризм СКК и гранулоцитов периферической крови находится в линейной зависимости с численностью вводимой клеточной популяции, что и было

подтверждено посредством введения различных количеств клеток, меченных GFP. Наилучшие результаты были достигнуты при введении 35000 мононуклеарных клеток костного мозга – химеризм гранулоцитов периферической крови составлял до 90%. Эти данные в перспективе можно использовать для подсчета оптимального числа СКК, необходимых для осуществления трансплантации в организм человека.

Таким образом, исследователи продемонстрировали, что эффективная трансплантация аллогенных СКК может быть осуществлена без уничтожения недифференцированных гемопоэтических клеток реципиента облучением или химиотерапией. Однако блокада c-kit не позволяет отказаться от использования радикальных мероприятий при онкологических заболеваниях, но является перспективным методом оптимизации трансплантации СКК. Кроме того, в работе упущена оценка возможных побочных реакций, связанных с блокированием CD117, экспрессия которого характерна для интерстициальных клеток Кахаля, меланоцитов, сперматогоний и тучных клеток [9, 10].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Buckley R., Schiff S., Schiff R. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. N. Engl. J. Med. 1999; 340: 508–16.
2. Appelbaum F., Herzig G., Ziegler J. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. Blood 1978; 52(1): 85–95.
3. Czechowicz A., Kraft D., Weissman I. Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. Science 2007; 318: 1296–99.
4. Gatti R.A., Meuwissen H.J., Allen H.D. et al. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. Lancet 1968; 2: 1366–69.
5. Micklem H. S., Clarke C. M., Evans E. P. et al. Fate of chromosome-marked mouse bone marrow cells transfused into normal syngeneic recipients. Transplant. 1968; 6(2): 299–302.
6. Tjonnfjord G. E., Steen R., Veiby O. P. Evidence for engraftment of donor-type

multipotent CD34⁺ cells in a patient with selective T-lymphocyte reconstitution after bone marrow transplantation for B-SCID. Blood 1994; 84(10): 3584–9.

7. Wingard J.R., Vogelsang G.B., Deeg H.J. Stem Cell Transplantation: Supportive Care and Long-Term Complications. Hematol. 2002; 422–44.

8. Chen J., Carcamo J., Golde D. The Subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor interacts with c-kit and inhibits c-kit signaling. J. Biol. Chem. 2006; 281(31): 22421–26.

9. Tsuura Y., Hiraki H., Watanabe K. et al. Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cell of skins, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma, and seminoma/ dysgerminoma in humans: immunohistochemical study of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Virchows Arch. 1994; 424: 135–41.

10. Sircar K., Hewlett B. R., Huizinga J. D. et al. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. Am. J. Surg. Pathol. 1999; 23: 377–89.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Czechowicz A., Kraft D., Weissman I. Efficient Transplantation via Antibody-Based Clearance of Hematopoietic Stem Cell Niches. Science 2007; 318: 1296–99

Антипролиферативный эффект мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток – фундаментальное свойство всех механоцитов

К настоящему времени накоплено большое количество данных о способности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток ММСК (предшественников механоцитов) к проявлению иммуносупрессивного эффекта в отношении практически всех типов клеток иммунной системы [1]. Однако способность терминально дифференцированных механоцитов к иммуномодуляции до сих пор оставалась малоизученной.

Исследовательская группа профессора F. Dazzi из Imperial College London поставила перед собой задачу оценить способность различных механоцитов человека к подавлению пролиферации активированной фракции Т-лимфоцитов. Авторами было проведено сравнительное исследование ММСК костного мозга взрослых людей, хондроцитов (ХЦ), синовиоцитов (СЦ), фибробластов легкого (ЛФ) и дермы

(ДФ). В качестве негативного контроля использовались культуры нейронов и клеток эндотелия.

Установлено, что вне зависимости от дифференцировочного потенциала и/или доли содержания ММСК в образце, все исследуемые клетки *in vitro* проявляли антипролиферативные свойства и предотвращали апоптоз активированных фитогемагглютинином (ФГА) или анти-CD3/CD28 мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). Клетки эндотелия и нейроны таких эффектов не вызывали.

Методом проточной цитометрии было показано, что все исследуемые типы механоцитов (ММСК, СФ, ДФ, ЛФ, ХЦ) имели сходный характер экспрессии поверхностных антигенов: все они экспрессировали МНС I, CD55, CD73, CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), при отсутствии экспрессии МНС II, CD14, CD45, CD80, CD86, CD106 (VCAM-1). Тестирование

способности вышеперечисленных клеток к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях показало, что дифференцировочный потенциал и содержание клеток предшественников сильно варьировало от образца к образцу. Наибольшее количество клеток, способных к билинейной дифференцировке, содержали образцы ММСК, напротив, ДФ были не способны к дифференцировке ни в одном из направлений. Промежуточное положение занимали ХЦ, культуры которых содержали некоторое количество клеток-предшественников, способных к адипогенной дифференцировке. По мнению авторов в исследовании использовались образцы механоцитов, имеющих разную степень дифференцированности и содержащие разное количество мультипотентных клеток-предшественниц.

Для изучения влияния исследуемых клеток на пролиферацию Т-лимфоцитов, проводили совместное культивирование фракций активированных ФГА или анти-CD3/CD28 МКПК с различными типами клеток в течение 3-х суток. Уровень пролиферации оценивали по включению радиоактивной метки 3H TdR в течение последних 15 часов культивирования. В присутствии любых механоцитов наблюдалось подавление пролиферации Т-лимфоцитов. Уровень пролиферации Т-лимфоцитов был прямо пропорционален количеству механоцитов в культуре. Антипролиферативная активность всех исследованных механоцитов по своей эффективности была сопоставима с таковой у ММСК. Совместное культивирование Т-лимфоцитов с нейронами или клетками эндотелия не вызывало такого эффекта.

При активации CD3⁺ лимфоцитов ФГА, происходило повышение уровня экспрессии этими клетками поверхностных антигенов CD69 и CD25. Присутствие механоцитов не оказывало влияния на уровень экспрессии этих антигенов, из чего авторы заключают, что воздействие стромальных клеток не затрагивает раннюю фазу активации Т-лимфоцитов.

Совместное культивирование фракции мононуклеарных клеток периферической крови и механоцитов в течение 3-х суток перед стимуляцией лимфоцитов ФГА и иономицином приводило к значительному снижению продукции Т-лимфоцитами цитокинов (IFN- γ и TNF- α) по сравнению с Т-клетками, культивировавшимися в отсутствие механоцитов. Для того, чтобы выяснить, необходим ли для проявления антипролиферативного эффекта прямой клеточный контакт, были исследованы супернатанты культур механоцитов. Супернатанты оказывали значительный антипролиферативный эффект только в том случае, когда они были получены от совместных культур механоцитов и анти-CD3/CD28-активированных лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36: 2566–73.
2. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838–38.
3. Zappia E., Casazza S., Pedemonte E. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy. *Blood* 2005; 106: 1755–61.
4. Krampfer M., Glennie M., Dyson J. et al. Bone marrow mesenchymal stem

Результаты были подтверждены при использовании системы Transwell. МКПК помещали в нижнюю камеру и активировали ФГА. Дermalные фибробласты (ДФ) либо культивировали в той же камере, либо физически отделяли с помощью мембраны. Когда ДФ контактировали с лимфоцитами, пролиферация последних замедлялась, в случае физического разделения клеток уровень пролиферации лимфоцитов не изменялся, однако, если активированные лимфоциты добавляли к механоцитам в верхней камере, пролиферация лимфоцитов в нижней камере существенно ингибировалась. Эндотелиальные клетки не оказывали никакого эффекта, даже при контакте с активированными лимфоцитами. Эти данные свидетельствуют о том, что механоциты оказывают своё антипролиферативное действие путем секреции растворимых факторов, но для этого им необходимо пройти стадию активации, которая запускается после контакта клеток.

S. Jones с соавт. считают, что антипролиферативный и протективный эффекты (показанные ими в отношении Т-лимфоцитов) являются уникальными характеристиками механоцитов, которые могли появиться в процессе эволюции для регуляции протекания воспалительных процессов в тканях. Той же группой исследователей недавно было показано, что ММСК оказывают антипролиферативный эффект и на некоторые другие клетки [5]. Последний факт приводит авторов к предположению, что механоциты разных тканей могут формировать ниши, которые регулируют иммунные реакции, а так же процессы пролиферации, выживания и самообновления резидентных клеток органов, аналогично тому, как это происходит в костном мозге.

Результаты, полученные в этой работе, согласуются с предыдущими публикациями, посвященными изучению иммуномодулирующих свойств ММСК [2–4]. Эти свойства уже находят применение в клинической практике, например для улучшения результатов трансплантации костного мозга и предотвращения реакции «трансплантат против хозяина». В литературе имеются данные об исследованиях в этом направлении и других типов стромальных клеток. Так, в работе C. Bocelli-Tyndall с соавт. (2006) сообщается о том, что хондроциты человека проявляли супрессивный эффект по отношению к анти-CD3-стимулированным Т-лимфоцитам [6]. M.A. Haniffa с соавт. (2007) показали, что дифференцированные дермальные фибробласты подавляют активацию аллогенных Т-лимфоцитов, активированных различными аутогенными стимуляторами [7]. В данном исследовании *in vitro* показано, что иммуномодулирующий эффект является общим свойством всех СК и их дифференцированных потомков. Данное открытие имеет большие перспективы для иммунорегуляторной клеточной терапии.

cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722–9.

5. Ramasamy R., Lam E., Soeiro I. et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 2007; 21: 304–10.

6. Bocelli-Tyndall C., Barbero A., Candrian C. et al. Human articular chondrocytes suppress in vitro proliferation of anti-CD3 activated peripheral blood mononuclear cells. *J. Cell. Physiol.* 2006; 209: 732–4.

7. Haniffa M., Wang X., Holtick U. et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J. Immunol.* 2007; 179(3): 1595–604.

Подготовила А.Д. Краснодембская

По материалам: Jones S., Horwood N., Cope A., Dazzi F. The Antiproliferative Effect of Mesenchymal Stem Cells Is a Fundamental Property Shared by All Stromal Cells. *J. Immunol.* 2007; 179: 2824–31

Применение iPS-клеток для восстановления гемопоэза на модели серповидно-клеточной анемии у мышей

Показано, что фибробласты человека и мыши можно «перепрограммировать» в клетки, подобные ЭСК, однако, терапевтический потенциал таких клеток в настоящее время не изучен [1, 2].

Группа исследователей под руководством R. Jaenish на модели серповидно-клеточной анемии у мышей показала, что трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), полученных от репрограммированных ЭСК-подобных клеток (iPS-клеток) позволяет избежать скорой гибели подопытных животных.

Авторы использовали «гуманизированную» модель серповидно-клеточной анемии. У животных линии C57black6/129Sv F1 – генетически идентичные мыши-реципиенты линии ген мышиного α -глобина был заменен на человеческий, и нормальный ген мышиного β -глобина, заменен на дефектные человеческие α и β s гены. У мышей, гомозиготных по человеческому аллелю β s, через некоторое время развивалась серповидно-клеточная анемия. Именно этих животных использовали в качестве доноров фибробластов.

Как и в предыдущей работе, авторы из фибробластов получали iPS клетки путем трансдукции ретровирусным вектором и селекции на среде с неомицином. Отобранные колонии имели ЭСК-подобную морфологию и экспрессировали AP, SSEA1 и Nanog. Полученные линии коммитировали в гемопоэтическом направлении и подвергали генетической коррекции дефектные гены глобина. Для этого проводили электропорацию клеток выбранной линии с конструктом, несущим ген нормального человеческого глобина β A.

Полученные после трансдукции клетки характеризовались экспрессией CD41 и c-kit, которые являются маркерами ГСК. Кроме того, клетки формировали колонии на метилцеллюлозе, что также отличает клетки гемопоэтического ряда.

Контролем на всех этапах эксперимента служили ранее полученные линии ЭСК мыши.

Исследуемые клетки (как экспериментальные, так и контрольные) трансплантировали летально облученным мышам. Как в опытной, так и в контрольной группе происходило

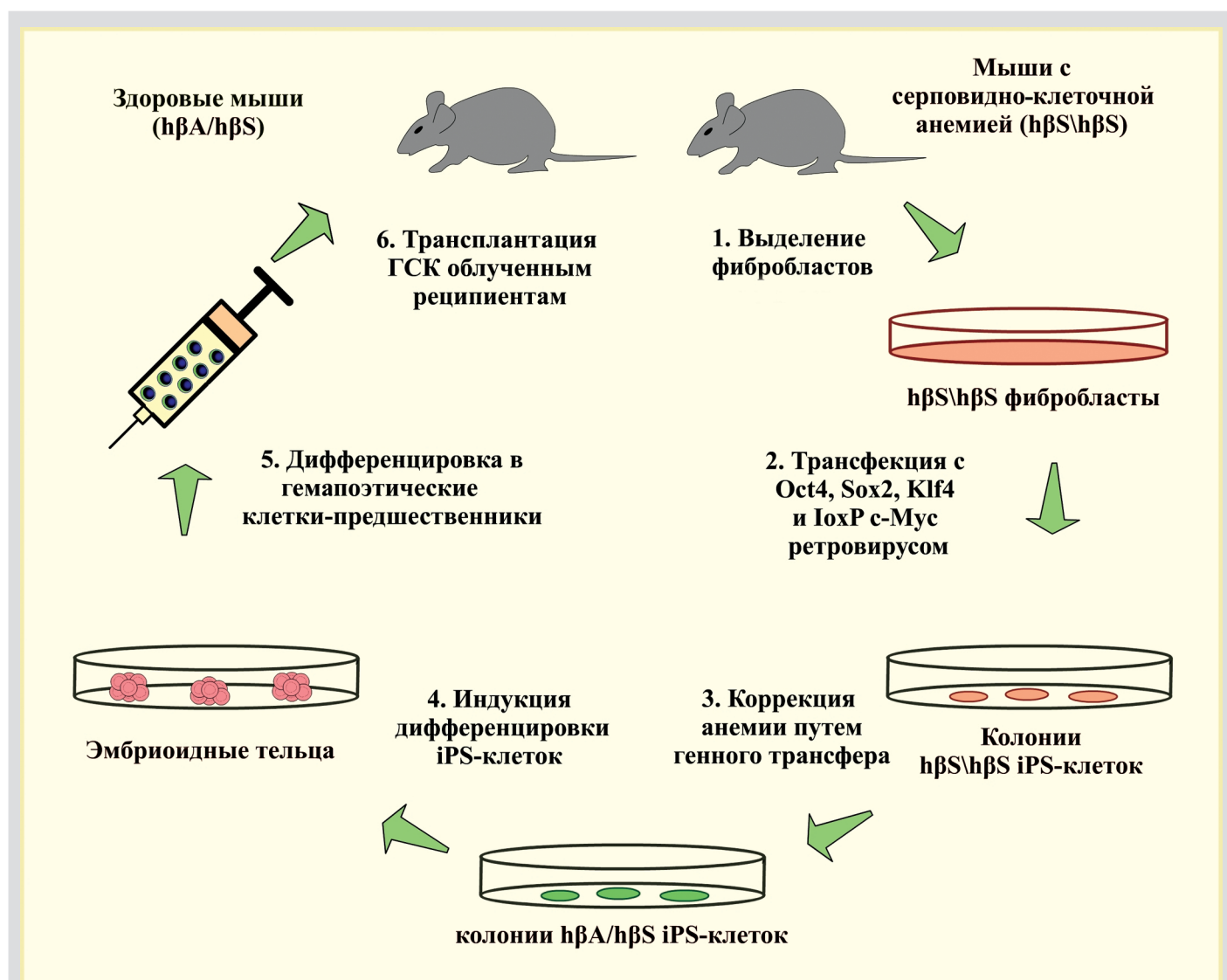


Схема мероприятий для коррекции серповидно-клеточной анемии

восстановление нормального кроветворения. Метод точной цитометрии позволил подтвердить, что миелоидные клетки формировались за счет введенных ГСК. О функциональной активности клеток свидетельствовало отсутствие в крови реципиентов аномальных форм человеческого β -глобина (HbA и HbS).

Все гематологические и физиологические показатели (масса животных, количество дыхательных движений в мин. и др.) пришли в норму. Несмотря на то, что ни у одного из подопытных животных не было обнаружено образования опухолей – «тератом» (образование которых также является характеристикой истинных ЭСК), исследователи не могут исключить этого в дальнейшем, на более поздних сроках.

Авторы предлагают следующую последовательность терапевтических мероприятий для коррекции серповидно-

клеточной анемии и др. гематологических заболеваний (рис.):

- репрограммирование (мутантных) донорских фибробластов в iPS-клетки;
- коррекция генетического дефекта с помощью гомологичной рекомбинации;
- дифференцировка полученных iPS-клеток в направлении гематоэтических клеток-предшественников;
- трансплантация гематоэтических клеток после тотального облучения донору.

Таким образом, совместное использование iPS-клеток и генной терапии позволяет добиться значительных успехов при лечении серповидно-клеточной анемии у мышей. Кроме того, работа позволяет сравнивать эффективность применения iPS с эффективностью применения ЭСК [3], и дает сделать вывод об их аналогичной эффективности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151): 318–24.
2. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse

- embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.
3. Wu L.C., Sun C.W., Ryan T.M. et al. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood* 2006; 108(4): 1183–8.

Подготовила В.С. Мелихова

По материалам: Hanna J., Wernig M., Markoulaki S. et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318: 1920–23

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Перфузионная модель искусственного сердца

Попытки создать функциональный эквивалент миокарда обычно наталкивались на невозможность восстановления коронарного кровотока, повторения его ангиоархитектоники и собственной проводящей системы [1]. Поэтому до настоящего времени в литературе появлялись работы посвященные созданию тканеинженерных конструкций, толщина которых обеспечивала бы выживаемость клеток после трансплантации в функционирующее сердце [2, 3]. Как известно, одним из методов, позволяющих обеспечить биоискусственный орган по всей толщине сосудистой сетью, является метод реперфузии сосудистого русла девитализированного органа суспензионной культурой эндотелиальных клеток. К приносящей артериальной ветви подсоединяется канюля, через которую под давлением производится перфузия среды содержащей эндотелиальные клетки, тогда как основные функциональные клетки органа вносятся в него в коллагеновом или фибриновом геле [4].

В недавнем номере журнала *Nature* опубликовано исследование научной группы D. Taylor из университета Миннесоты по получению функционального сердца методом реперфузии и ретрансплантации кардиомиоцитов. Полученные от взрослых особей 28 сердец были девитализированы, отмыты и заселены эмбриональными крысиными

кардиомиоцитами. Заселение эндотелиальными клетками сосудистого русла было выполнено путем подключения к аорте проточной перфузионной системы с отводом жидкости через полость правого желудочка. Кардиомиоциты были инъецированы в толщу миокарда. Через некоторое время подключали кардиостимулятор и обеспечивали пульсирующий ток среды. В результате была получена функционирующая модель сердца с сосудистой сетью и миокардом, отвечающим ритмичными физиологическими сокращениями в ответ на стимуляцию.

Таким образом, передовые технологии тканевой инженерии III поколения позволили воплотить в жизнь идею функционирующего сердца. В дальнейшем следует ожидать исследований, связанных с трансплантацией данной модели, хотя использование этой технологии без изменений сопряжено с необходимостью использования как минимум иммунодефицитных животных или перехода на аутогенный клеточный материал. Без сомнения данное исследование является революционным, даже если рассматривать данную модель искусственного сердца в качестве тест-системы для медицинской фармакологии, актуальность которой также не подвергается сомнению [5].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Caspi O., Lesman A., Basevitch Y. et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ. Res.* 2007; 100: 263–72.

2. Siepe M., Giraud MN., Liljensten E. et al. Construction of skeletal myoblast-based polyurethane scaffolds for myocardial repair. *Artif. Organs* 2007; 31(6): 425–33.
3. Gaballa M.A., Sunkomat J.N., Thai H. et al. Grafting an acellular 3-dimensional collagen scaffold onto a non-transmural infarcted myocardium

induces neo-angiogenesis and reduces cardiac remodeling. J. Heart Lung Transplant. 2006; 25(8): 946–54.

4. Walles T., Giere B., Hofmann M. et al. Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized trachea. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.

2004; 128(6): 900–6.

5. Franchini J.L., Propst J.T., Comer G.R., Yost M.J. Novel tissue engineered tubular heart tissue for in vitro pharmaceutical toxicity testing. Microsc. Microanal. 2007; 13(4): 267–71.

Подготовил А.В. Волков

По материалам: Ott H., Matthiesen T., Goh S.K. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nature Medicine 2008; 14: 213–21

HUMAN STUDY

К вопросу о несостоятельности концепции применения колониестимулирующих факторов для лечения ИБС

Стратегия использования колониестимулирующих факторов для лечения ишемической болезни сердца сформировалась примерно к 2000 году. Суть идеи заключалась в том, чтобы усилить миграцию стволовых и прогениторных клеток из костного мозга в поврежденные участки миокарда. При этом методика обещала быть весьма несложной в реализации: лечение должно было состоять из курса парентеральных инъекций зарегистрированных фармпрепаратов (Филграстим, Нейпоген и др.), которые к тому времени уже длительное время традиционно использовались для лечения цитопенических состояний. Первые экспериментальные результаты на мышах были обнадеживающие [1]. Первые клинические работы показали эффективность такого подхода [4], хотя и небольшую. Однако вскоре появились статьи об отсутствии эффекта G-CSF у крупных лабораторных животных: свиней [2] и обезьян [3]. Видимо, в связи с этим вскоре исследователи стали реализовывать идею более инвазивного вмешательства: после применения колониестимулирующих факторов (КСФ) из периферической крови получали мононуклеарную фракцию, которую трансплантировали интракоронарно в инфаркт-связанную артерию.

Показано, что применение КСФ ведет к увеличению содержания CD34⁺ клеток в периферической крови. Многие связывают эффекты от применения КСФ для лечения ИБС именно с этими клетками: изучались вопросы распределения CD34⁺ клеток в миокарде, в том числе и после их интракоронарного введения [12]. Учитывая возможность значительного накопления клеток в миокарде после их интракоронарной трансплантации, можно связать эффекты с выделяемыми клетками цитокинами, ростовыми факторами, а также с непосредственным антиапоптотическим действием КСФ [9].

Недавно были опубликованы результаты клинических исследований, в которых пациентам с острым инфарктом миокарда после имплантации стента в инфаркт-связанную артерию в нее же дополнительно вводили клетки, полученные путем афереза периферической крови после курса Г-КСФ. Первое исследование [5, 6] проводилось в Корее (Myocardial regeneration and Angiogenesis with G-CSF and Intra-Coronary stem Cell – MAGIC Cell), второе – в Австрии [7].

Корейское исследование, проводимое под руководством H.S. Kim, ценно интересным дизайном. Пациенты с острым

инфарктом миокарда (ОИМ) были разделены на 3 группы: первая группа получала КСФ и интракоронарную трансплантацию, вторая – только КСФ, третья – контрольная. Все пациенты получали адекватную медикаментозную терапию и перенесли установку стента в инфаркт-связанную артерию. Оказалось, что первая группа была лучше по таким значимым показателям как фракция изгнания (прибавка 6,2% против уменьшения на 4,3% во второй группе) и конечный систолический объем (снижение на 15,7% против неизменного во второй группе). Недостатком этого исследования явилось малое количество пациентов, поскольку не удалось показать статистически значимые отличия указанных показателей от контрольной группы. В Китае было проведено похожее исследование. Показано, что через 6 месяцев после интракоронарной трансплантации КСФ-стимулированных клеток крови фракция выброса достоверно увеличивалась на 7%, конечный систолический объем достоверно уменьшался почти на 17%. В контрольной группе, получавшей традиционное лечение, эти и другие параметры, как и в работе из Кореи, статистически значимо не отличались [8].

Недавно корейская команда опубликовала небольшое дополнение к своей работе: оказалось, что в группе с трансплантацией клеток в интима проксимальнее и дистальнее стента образуются утолщения неоинтимы, тогда как в проекции самого стента их не было (нет отличий от контрольной группы). Как повлияют эти изменения на дальнейшую перфузию стентированного сосуда, покажет время. Что касается работы австрийских исследователей F. Leisch с соавт., то они привели более тревожные результаты. Из 24 пациентов, получивших лечение аутоклетками, у троих произошел тромбоз стента (через 2, 6 и 14 месяцев после процедуры), тогда как опыт стентирования показывает, что при имплантации стентов без покрытия эти осложнения очень редки.

Сомнения вызывают и сами исследования. Обычно после стентирования и адекватного лечения у пациентов наблюдается улучшение сократительной функции сердца в отдаленном периоде (более 6 месяцев). Однако практически во всех вышеописанных исследованиях в контрольной группе положительных сдвигов не наблюдалось. Этот странный факт, конечно, может быть вызван малыми размерами групп пациентов, но заставляет усомниться в истинной эффективности КСФ.



В этой связи полезно вспомнить 2 статьи, опубликованные в 2005 году в Journal of the American College of Cardiology. Несмотря на то, в этих исследованиях было показано, что ГМ-КСФ и Г-КСФ стимулируют образование новых коронарных сосудов, оба они были преждевременно остановлены из-за неудовлетворительных промежуточных результатов. В отчете S. Zbinden с соавт. [10], ГМ-КСФ в течение двух недель применяли у пациентов со стабильной стенокардией перед стентированием. В течение 12 дней после лечения у двух из семи пролеченных пациентов развился острый инфаркт миокарда. В исследовании [11] 2 из 16 пациентов с рефрактерной стенокардией, получавших Г-КСФ в течение пяти дней, перенесли острый инфаркт миокарда, один пациент при этом умер.

Кроме того, никого не удивит тот факт, что имеет место заинтересованность фармкомпаний, производящих дорогостоящие препараты КСФ, в их использовании для лечения такого распространенного заболевания как ИБС. Несомненно, многие исследования прямо или косвенно инициированы и профинансированы именно фармфирмами. И даже несмотря на это появляются публикации, в которых авторы сомневаются в рациональности использования КСФ для лечения различных форм ИБС. Критически оценивая многочисленные публикации по этой тематике, можно говорить о сомнительной эффективности и потенциальной опасности различных вариантов терапии КСФ при ИБС.

Подготовил И.В. Потапов

По материалам: Kang H.J., Kim Y.S., Koo B.K. et al. Effects of Stem Cell Therapy with G-CSF on Coronary Artery after Drug-Eluting Stent Implantation in Patients with Acute Myocardial Infarction. Heart. 2007. Dec 10. [Epub ahead of print].
Steinwender C., Hofmann R., Kypka A. et al. Late stent thrombosis after transcatheter transplantation of granulocyte-colony stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells following primary percutaneous intervention for acute myocardial infarction. International J. Cardiol. 2007: 122; 248–9