

НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Обнаружены не описанные популяции клеток, участвующие в развитии сердца

Понимание эмбриогенеза сердца необходимо для раскрытия механизмов патогенеза врождённых и приобретённых сердечных заболеваний [1, 2], а также для разработки подходов к их клеточной терапии [3]. Известно, что существуют две различные популяции кардиомиоцитарных клеток-предшественниц, различающихся по времени их вступления в процесс кардиомиогенеза и характеризующихся экспрессией транскрипционных факторов *Isl1* (*Isl1*) и *Nkx2-5* [4–6]. Первая популяция — это клетки прекардиальной мезодермы, из которых формируется примитивная сердечная трубка. Более поздние клетки-предшественницы — это клетки так называемого вторичного или переднего сердечного поля, которые дифференцируются в кардиомиоциты правого желудочка и в гладкомышечные клетки стенок крупных сосудов, отходящих от сердца [4].

Недавно научная группа С.-Л. Саи сообщила о выделении из тканей проэпикарда мыши новой популяции мультипотентных стволовых клеток, экспрессирующих маркерный белок *Tbx18*. Уже около десяти лет назад было известно, что во время эмбриогенеза клетки проэпикарда формируют эпикард, а часть из них претерпевает так называемый эпителиально-мезенхимный переход (в англоязычной литературе — *epithelial-to-mesenchymal transition*) и мигрирует в миокард, где даёт начало гладкомышечным клеткам собственных сосудов сердца, эндотелиальным клеткам, кардиомиоцитам и адвентициальным фибробластам [7–9]. Однако можно ли назвать клетки проэпикарда гомогенной популяцией, или они включают в себя несколько различных популяций стволовых клеток, до настоящего времени было не выяснено.

Белок *Tbx18* не является описанным *de novo*, это известный маркер клеток проэпикарда. Недавно было показано, что при повреждениях сердца у рыбки *Danio rerio* происходит реактивация экспрессии *Tbx18* в эпикарде [10]. Отдельные клетки, в которых произошла такая реактивация, приобретают способность к миграции и формируют кластеры в зоне повреждения, где, по мнению исследователей, участвуют в регенерации, что указывает на их возможную мультипотентность [10, 11].

С.-Л. Саи и соавт. удалось показать, что *Tbx18*-экспрессирующие клетки составляют самостоятельную популяцию в пределах проэпикардиальных клеток. При дифференцировке *in vivo* в процессе эмбриогенеза *Tbx18*⁺ клетки мигрируют в стенки желудочков и предсердий, где начинают экспрессировать маркерные белки кардиомиоцитов: сердечный тропонин Т (*cTnT/Tnnt*), сердечный тропонин I (*cTnI/Tnnt*) и миозин саркомеров.

Также эти клетки экспрессируют транскрипционные факторы *Gata4* и *Nkx2-5*, как и уже известные кардиомиоцитарные клетки-предшественницы.

Уникальность популяции *Tbx18*⁺ клеток была подтверждена тем, что они не экспрессируют маркеров *Isl1* и *MLC2a* (также известного как *Myl7*), характерных для ранних предшественников кардиомиоцитов.

In vitro 37% *Tbx18*⁺ клеток, выделенные из проэпикарда, способны образовывать колонии, а 34% из этих колоний, в свою очередь, дифференцируются в кардиомиоциты с характерной цитоархитектоникой, экспрессией маркерного белка *cTnT* и способностью к спонтанным сокращениям, а также в гладкомышечные клетки, характеризующиеся экспрессией тяжёлых цепей гладкомышечного миозина. Таким образом, не все, но многие клетки проэпикарда обладают мультипотентностью (авторы работы расценивают это свойство как плюрипотентность, что, по-видимому, ошибочно).

Клетки уже сформированного, взрослого эпикарда способны к миграции после реактивации экспрессии *Tbx18* [13]. С.-Л. Саи и соавт. попытались выяснить, обладают ли эти мигрирующие элементы дифференцировочным потенциалом, характерным для их проэпикардиальных предшественниц. Но, к их разочарованию, эти клетки в подходящих культуральных условиях дифференцировались лишь в гладкомышечные клетки сосудов, и никогда — в кардиомиоциты, что подтвердилось неспособностью их потомков экспрессировать ген *cTnT*. Причины, лежащие в основе такого различия дифференцировочного потенциала, могли бы оказаться очень существенными для попыток использовать клетки эпикарда в регенеративной терапии заболеваний сердца. На данный момент, однако, следует констатировать, что эти клетки не могут быть применены как источник кардиомиоцитов.

Ещё одно интересное дополнение к картине развития сердца в эмбриогенезе сделала недавно научная группа В. Zhou. Исследователи показали, что в процессе дифференцировки *Nkx2-5*⁺/*Isl1*⁺ клетки дают начало популяции, экспрессирующей маркер *Wt1*, которая локализуется в проэпикарде и, в свою очередь, дифференцируется в функциональные кардиомиоциты, мозаично распределяющиеся в пределах миокарда и межжелудочковой перегородки. Авторы подтвердили это, выявив экспрессию клетками *Wt1*⁺ популяции сердечного тропонина Т и актина саркомеров (*Actn1*), а также транскрипционных факторов *Gata4* и *Nkx2-5*.

В культуре *in vitro* *Wt1*⁺ клетки дифференцировались в кардиомиоциты, способные к спонтанным сокращениям и генерированию кальциевого тока на мембране,

кальциевых волн и кальциевых пиков, и помимо этого были способны давать начало эндотелиальным клеткам и клеткам гладкой мускулатуры сосудов.

Каким образом $Wt1^+$ клетки соотносятся с $Tbx18^+$ клетками, неясно, так как авторы работы не анализировали их на предмет экспрессии $Tbx18$. В действительности, они отличаются лишь способностью образовывать эндотелий сосудов: $Wt1^+$ клетки могут дифференцироваться в эндотелиальные элементы, а $Tbx18^+$ — нет. К сожалению, пока не создано общей картины экспрессии стадийспецифических маркеров, позволяющей получить исчерпывающее представление о кардиомиогенезе, и говорить о $Tbx18^+$ и $Wt1^+$ клетках как о самостоятельных клеточных популяциях, по-видимому,

преждевременно. Скорее, они представляют собой различные стадии коммитирования уже известных клеточных предшественниц. Также сомнительна их перспективность для клеточной терапии.

Неясно также, насколько видоспецифична экспрессия некоторых из описанных маркеров. Обсуждаемые эксперименты были проведены на мышах, однако более ранние работы на куриных эмбрионах показали иные результаты, свидетельствующие о том, что клетки проэпикарда вовсе не дифференцируются в кардиомиоциты *in vivo* [14–18]. Это ставит под сомнение о возможности экстраполяции данных, полученных на экспериментальных объектах, на эмбриогенез сердца человека.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Olson E. N. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nature Med.* 2004; 10: 467–74.
2. Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 2006; 126: 1037–48.
3. Murry C.E., Field L.J., Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 2005; 112: 3174–83.
4. Buckingham M., Meilhac S., Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Rev. Genet.* 2005; 6: 826–35.
5. Cai C.-L., Liang X., Shi Y. et al. *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell* 2003; 5: 877–89.
6. Kelly R., Evans S.M. The secondary/anterior heart field. *Heart Development and Regeneration* (eds Rosenthal, N. & Harvey R. P.) (Academic, San Diego, in the press).
7. Mikawa T., Fischman D. A. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1992; 89: 9504–8.
8. Mikawa T., Gourdie R.G. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev. Biol.* 1996; 174: 221–32.
9. Gittenberger-de Groot A.C., Vrancken Peeters M.P., Mentink M.M., Gourdie R.G., Poelmann R.E. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ. Res.* 1998; 82: 1043–52.
10. Lepilina A., Coon A.N., Kikuchi K. et al. A dynamic epicardial injury

response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 2006; 127: 607–19.

11. Kraus F., Haenig B., Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse *T-box* gene *Tbx18*. *Mech. Dev.* 2001; 100: 83–6.
12. Pérez-Pomares J.M., Carmona R., González-Iriarte M. et al. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 2002; 46: 1005–13.
13. Smart N., Risebro C.A., Melville A.A. et al. Thymosin b4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 2007; 445: 177–82.
14. Wilm B., Ipenberg A., Hastie N.D., Burch J.B., Bader D.M. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* 2005; 132: 5317–28.
15. Merki E., Zamora M., Raya A. et al. Epicardial retinoid X receptor a is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005; 102: 18455–60.
16. Gittenberger-de Groot A.C., Vrancken Peeters M.P., Mentink M.M., Gourdie R.G., Poelmann R. E. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ. Res.* 1998; 82: 1043–52.
17. Dettman R.W., Denetclaw W.J., Ordahl C.P., Bristow J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev. Biol.* 1998; 193: 169–81.
18. Mikawa T., Gourdie R.G. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev. Biol.* 1996; 174: 221–32.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Cai C.-L., Martin J.C., Sun Y. et al. A myocardial lineage derives from *Tbx18* epicardial cells. *Nature* 2008; 454: 104–8.

Zhou B., Ma Q., Rajagopal S., Wu S.W. et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008; 453: 109–14

Межвидовой перенос ядра: непреодолимый природный барьер или временное техническое препятствие?

Клонирование методом переноса ядра (somatic cell nuclear transfer, SCNT) с целью получения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека сталкивается с серьезными морально-этическими проблемами, связанными с использованием женских овоцитов [1]. Так, если исследования ЭСК приведут к их рутинному использованию в клинической практике, то овоциты могут стать своего рода товаром, а женщины попадут под особое давление. Кроме того, отдаленные последствия самой процедуры получения овоцитов у женщин-доноров (к примеру, связанные с многократной гормональной стимуляцией) пока не ясны. К настоящему моменту предложено несколько альтернатив, позволяющих не привлекать овоциты для получения ЭСК. Во-первых, — это

отказ от использования овоцитов вообще и переход от технологии переноса ядра к направленному репрограммированию генома за счет активации экспрессии определенных генов (получение iPS-клеток). Во-вторых, — индукция дифференцировки овоцитов из стволовых клеток другого происхождения. В-третьих, попытки применения овоцитов от других видов животных (т. н. межвидовой SCNT, iSCNT).

В своем классическом варианте метод SCNT заключается в пересадке ядра (кариопласта) соматической клетки в предварительно энуклеированную яйцеклетку (цитопласт), находящуюся в профазе II деления мейоза. Благодаря данной технологии к настоящему моменту удалось клонировать многие виды животных, а также

получить бластоцисты человека [2]. В случае iSCNT источником кариопласта и цитопласта являются клетки, происходящие от различных видов животных, но в этом случае эффективность метода значительно снижается, и успешное репродуктивное клонирование остается возможным лишь при использовании близкородственных видов [3]. Эмбрионы, полученные с помощью процедуры iSCNT, способны развиваться до стадии бластоцисты и в некоторых случаях давать начало культуре ЭСК.

Причина низкой жизнеспособности и нарушений развития таких межвидовых гибридов лежит в несовместимости цитоплазматических факторов (мРНК и белков) овоцита и вводимого генетического материала, который содержится в ядре соматической клетки. Хотя генная транскрипция в клетках сформированного зародыша может наблюдаться уже на самых ранних стадиях деления [4], за эмбриональное развитие длительное время (вплоть до 16-клеточной стадии у коровьего эмбриона) в основном отвечают продукты, заранее накопленные в овоците. Полагают, что явление «перепрограммирования» ядра, наблюдаемое при SCNT, зависит именно от этих овоцитарных факторов.

Кроме того, несовместимость цитоплазмы и ядра в межвидовых гибридных эмбрионах, приводящая в итоге к их гибели, во многом связана с присутствием в цитоплазме эмбриональных клеток чужеродного митохондриального генома. Как и в случае переноса ядра, трансфер митохондрий из клеток животного одного вида в лишённые митохондрий клетки животного другого вида может быть успешен лишь у близкородственных видов. Например, в клеточных линиях человека, не содержащих митохондрий, «приживаются» и функционируют митохондрии из клеток шимпанзе и гориллы, чего, однако, не происходит с митохондриями орангутана [3]. Более того, в период имплантации экспрессия минорных антигенов гистосовместимости, кодируемых «чужеродной» митохондриальной ДНК, потенциально может приводить к иммуноопосредованному отторжению гибридного эмбриона.

Полагают, что в межвидовых гибридных эмбрионах происходит дисрегуляция генной экспрессии вследствие несовместимости цитопласта и кариопласта. Известно, к примеру, что активация ядра (активация генной транскрипции в клетках эмбриона после оплодотворения) у разных видов происходит в различные моменты развития [4], что может отражаться на процессах перепрограммирования ядра в межвидовых гибридах. Тем не менее, до настоящего времени характер транскрипции генов, задействованных в контроле эмбриогенеза в межвидовых SCNT-гибридах не анализировался. Особый интерес в этом случае представляет исследование экспрессии генов, контролирурующих недифференцированный статус эмбриональных клеток, вовлечённых в адгезионные взаимодействия во время образования морулы и бластоцисты, а также отвечающих за первичную клеточную специализацию в бластоцисте.

Какое влияние оказывают чужеродные цитоплазматические факторы на активацию и динамику генной экспрессии в межвидовых гибридных эмбрионах? На этот вопрос попытались ответить китайские исследователи под руководством H.Z. Sheng и D.Y. Chen, которые для анализа выбрали три центральных регулятора плюрипотентности — транскрипционные факторы Oct4, Sox2 и Nanog, а также E-кадгерин — адгезивную молекулу, необходимую для формирования бластоцисты (установления адгезионных контактов в трофобласте). При этом источником цитопласта служил овоцит коровы, а генетический

материал принадлежал фибробласту человека. Подходящие для эксперимента незрелые овоциты отбирались по морфологическим критериям (гомогенность цитоплазмы, наличие нескольких слоев фолликулярных клеток), после чего клетки культивировались до достижения зрелого состояния. В эксперименте использовали овоциты, находящиеся в метафазе II деления мейоза. После обработки цитохалазином В проводилась аспирация митотических хромосом и первого полярного тельца с помощью микропипетки. Затем в перивителлиновое пространство знуклеированного овоцита помещали человеческий фибробласт. Слияние цитоплазматических мембран полученного гибридного комплекса проводилось с помощью электрофузионной системы. Через 3 часа гибридные эмбрионы подвергались химической активации иономицином и культивировались на монослое мышинных эмбриональных фибробластов.

Успешность процедуры iSCNT подтверждалась на стадии 16-клеточного эмбриона методом качественной ПЦР с использованием праймеров к специфическим последовательностям генома человека и коровы (соответственно альфоидная и Alu-подобная последовательности). Анализ экспрессии мРНК транскрипционных факторов человека Oct4, Sox2 и Nanog, а также E-кадгерина проводили методом обратнотранскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР). В качестве «референсной» экспрессии анализировалась экспрессия гена β-актина человека, а положительным контролем ОТ-ПЦР служила экспрессия гомологичного фрагмента β-актина, общего для человека и коровы. Последовательность амплифицированных ПЦР-продуктов была затем подтверждена путем секвенирования.

Всего было осуществлено 28 опытов по переносу ядра, в результате которых исследователи получили 3315 гибридных эмбрионов. Из них 8-клеточной стадии достигли 21,4% гибридов, 16-клеточной — 9%, стадии бластоцисты — 0,87% (29 гибридов). Сама технология получения таких цитоплазматических гибридов оказалась высоко эффективной: абсолютное большинство проанализированных 16-клеточных гибридных зародышей содержало геном человека, о чем свидетельствовало присутствие характерных альфоидных повторов.

Экспрессия генов человека Oct4, Sox2, Nanog и E-кадгерина анализировалась сразу после слияния клеток, на 2-, 4-, 8-, 16-клеточной стадиях, стадии морулы и бластоцисты. Интересно, что уже на одноклеточной стадии у некоторых гибридов был отмечен низкий уровень экспрессии Oct4 (2 из 24) и Sox2 (3 из 47). По словам авторов, экспрессия факторов транскрипции Oct4 и Sox2 может также наблюдаться в фибробластах еще перед слиянием. Действительно, в литературе имеют место сообщения о том, что в некоторых дифференцированных клетках может отмечаться слабая, но устойчивая экспрессия этих генов плюрипотентности [5]. Тем не менее, значимость подобной экспрессии не ясна, и, более того, это может быть результатом амплификации присутствующих в геноме псевдогенов, что, в частности, было недавно показано для Oct4 [6].

Активация генной транскрипции в гибридных эмбрионах происходила при переходе от 8-клеточной к 16-клеточной стадии развития: на обеих стадиях отмечалась выраженная экспрессия всех четырех исследуемых генов. Это позволило авторам сделать вывод о том, что время активации эмбрионального генома определяется факторами, происходящими от клетки-донора цитопласта, т. е. коровьего овоцита. У эмбриона человека запуск генной транскрипции происходит несколько

раньше, чем у крупного рогатого скота – при переходе от 4- к 8-клеточной стадии [7].

Тем не менее, генная экспрессия в полученных гибридных эмбрионах была неоднородной и, по-видимому, носила случайный характер. В то время как в одних гибридных клетках отмечалась выраженная экспрессия всех четырех генов, в других обнаруживались лишь некоторые транскрипты либо экспрессия вовсе не была выявлена. Следует заметить, что нарушение экспрессии Oct4 и других функционально схожих генов обнаружено и в клетках эмбрионов, клонированных «классическим» методом, без использования межвидового переноса ядра [8]. Далее авторы отмечают, что более выраженный потенциал эмбриона к дальнейшему развитию отражается в более активной экспрессии генов Oct4, Sox2, Nanog и E-кадгерина (все гибриды, достигшие стадии бластоцисты, экспрессировали указанные гены). Если же генетический материал гибридной клетки недостаточно активирован, то эмбриогенез останавливался.

Авторы данной работы не ставили своей целью получить линию ЭСК из эмбриобласта гибридных бластоцист. В 2003 г. эта исследовательская группа уже опубликовывала результаты схожего эксперимента, где в качестве донора цитоплазмы вместо коровьего овоцита выступал овоцит кролика [9]. Происхождение полученных таким образом ЭСК человека было подтверждено с помощью цитогенетических методов, ПЦР-анализа и иммуноцитохимии. Однако гибридные ЭСК, дифференцировавшиеся в клетки трех зародышевых листков *in vitro*, не вызывали развития тератом после введения иммунодефицитным мышам, что, как известно, имеет основное значение для доказательства их плюрипотентного статуса [3].

В статье также не уточняется, каким образом анализировался профиль экспрессируемых генов на более поздних предимплантационных стадиях (морула, бластоциста), на которых начинаются процессы клеточной специализации. Очевидно, что экспрессия транскрипционных регуляторов плюрипотентности будет отличаться в клетках трофобласта и внутренней клеточной массы. Например, известно, что экспрессия Oct4 значительно снижена в клетках трофобласта человека [10].

Пока не ясно, какое влияние может оказывать присутствие митохондриальной ДНК овоцита на характер и время экспрессии плюрипотентных генов в гибридных эмбрионах. Интересно также отметить, что в этой работе для интеграции ядра фибробласта в цитоплазму овоцита использовали слияние, что предполагает попадание митохондрий фибробласта в гибридный эмбрион. Вопрос о том, каким образом происходит совмещение двух митохондриальных геномов в одной клетке, и как это влияет на развитие зародыша и генную экспрессию в ходе эмбриогенеза, пока остается открытым.

Одна из задач будущих исследований – анализ дифференциального вклада различных факторов гибридной несовместимости в глобальные перестройки генной экспрессии в межвидовых гибридах. Вероятно, что за нарушенное перепрограммирование генома и дефектное развитие гибридного зародыша ответственные лишь некоторые факторы овоцитарной цитоплазмы. В результате, генетическая модификация овоцитов перед процедурой iSCNT сможет снизить последствия гибридной несовместимости и сделать получение пациент-специфических ЭСК человека с помощью описанной технологии реальной возможностью.

ЛИТЕРАТУРА:

1. McLaren A. A scientist's view of the ethics of human embryonic stem cell research. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 23–6.
2. French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer (SCNT) with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485–93.
3. Tecirlioglu R.T., Guo J., Trounson A.O. Interspecies somatic cell nuclear transfer and preliminary data for horse-cow/mouse iSCNT. *Stem Cell Rev.* 2006; 2(4): 277–87.
4. Hamatani T., Ko M.Sh., Yamada M. et al. Global gene expression profiling of preimplantation embryos. *Hum. Cell* 2006; 19(3): 98–117.
5. Takeda J., Seino S., Bell G.I. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 4613–20.

6. Liedtke S., Enczmann J., Wacławczyk S. et al. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell* 2007; 1(4): 364–6.
7. Braude P., Bolton V., Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332(6163): 459–61.
8. Bortvin A., Eggen K., Skaletsky H. et al. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Devel.* 2003; 130(8): 1673–80.
9. Chen Y., He Z.X., Liu A. et al. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Res.* 2003; 13(4): 251–63.
10. Hansis C., Grifo J.A., Krey L.C. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6(11): 999–1004.

Подготовил А.А. Леявский

По материалам: Li F., Cao H., Zhang Q. et al. Activation of Human Embryonic Gene Expression in Cytoplasmic Hybrid Embryos Constructed between Bovine Oocytes and Human Fibroblasts. *Cloning Stem Cells* 2008; 10(3): 297–306

Предотвращение острого и хронического отторжения трансплантатов у мышей адоптивным введением $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов

Пересадка аллогенных клеток, тканей или органов человека иммунокомпетентному реципиенту сопровождается индукцией иммунного ответа, часто являющегося причиной несостоятельности трансплантата. Для профилактики данного осложнения в клинической практике широко используются иммунодепрессанты. Однако, даже длительное применение препаратов этой группы не предотвращает хронического отторжения и, кроме того, чревато развитием тяжелых побочных эффектов. Альтернативой иммунодепрессантам выступают методы индукции специфической иммунологической толерантности к аллоантигенам. В перспективе, эти методы должны основываться на физиологических механизмах индукции и поддержания специфической толерантности, не сопровождаются системной иммуносупрессией, предотвращают как острое, так и хроническое отторжение и, следовательно, должны быть лишены большинства присущих иммунодепрессантам недостатков.

В разное время было предложено много протоколов индукции специфической иммунологической толерантности, как правило, избирательно воздействующие на то, или иное звено трансплантационного иммунитета. Они включают предварительную деплецию антигенпрезентирующих клеток (АПК) в трансплантате [1], создание гемопозитического химеризма [2], введения разных популяций толерогенных дендритных клеток и/или регуляторных Т-лимфоцитов [3, 4] и др. Несмотря на то, что в целом ряде экспериментов удается избежать реакций острого отторжения, во всех случаях неотвратимо наступает хроническое иммунное поражение, что приводит к прогрессирующему повреждению трансплантатов и не позволяет отказаться от иммунодепрессантов. Кроме того, предложенные протоколы характеризуются плохой воспроизводимостью, что не дает необходимой уверенности для начала клинических испытаний. В настоящее время большинство специалистов пришло к выводу о том, что, по-видимому, нельзя получить приемлемые результаты, воздействуя лишь на одно звено трансплантационного иммунитета.

В журнале *Nature Medicine* опубликовано исследование научной группы J. van Meerwijk, в котором анализировалась возможность индукции иммунологической толерантности к аллогенным трансплантатам кожи и сердца с помощью комбинированного протокола, включавшего кондиционирование мышей с клинически допустимыми дозами облучения, трансплантацию клеток костного мозга и введения аллоантигенспецифичных $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs).

Tregs играют ключевую роль в предотвращении аутоиммунных заболеваний, в регуляции иммунитета к вирусным и паразитарным инфекциям, поддержании материнской толерантности к плоду и в ингибировании противоопухолевого иммунного ответа [5–9]. В связи с этим многие специалисты считают весьма перспективной разработку методов индукции иммунологической толерантности к аллотрансплантатам с использованием Tregs [10]. J. van Meerwijk и соавт. — одни из первых,

кто разработал эффективный метод выделения и экспансии Tregs с необходимой специфичностью [11]. В настоящем исследовании авторы выделяли Tregs у мышей линии C57BL/6 (B6, H-2b) и культивировали их в присутствии АПК мышей линии DBA/2 (H-2d). В созданных условиях экспансии подвергались Tregs, распознающие комплексы пептидов с молекулами МНС-II (H-2d) — H-2d-специфичные Tregs.

Совместное введение аутогенных H-2d-специфичных Tregs с клетками костного мозга мышей линии DBA/2 (H-2d) сублетально облученным животным линии B6 (H-2b) приводило к возникновению стойкого гемопозитического химеризма, свидетельствующего о приживлении трансплантата, тогда как введение только клеток костного мозга сопровождалась выраженным отторжением в течение 3 нед. С другой стороны, одновременное введение аутогенных H-2d-специфичных Tregs и трансплантация лоскутов кожи от мышей DBA/2 (H-2d) мышам B6 (H-2b) не приводили к существенному изменению динамики отторжения трансплантата и, следовательно, введение H-2d-специфичных Tregs не является достаточным условием для индукции иммунологической толерантности к трансплантатам мышей, экспрессирующих H-2d.

Анализируя причину неудачи, авторы предположили, что эффект адоптивного переноса H-2d-специфичных Tregs ограничен их естественной гибелью в организме реципиента, обусловленной недостаточностью важной для жизнедеятельности лимфоцитов антигенной стимуляции. В случае трансплантации клеток костного мозга, дифференцирующиеся из гемопозитических предшественников АПК донорского происхождения могут предоставлять адекватную стимуляцию. В подтверждении этой гипотезы, анализ выживаемости аутогенных H-2d-специфичных Tregs при одновременном введении с клетками костного мозга мышей DBA/2 (H-2d) сублетально облученным мышам линии B6 (H-2b) показал, что Tregs стабильно персистировали, главным образом, в селезенке, вокруг очагов экстрамедуллярного кроветворения и поддерживали экспрессию Foxp3.

Учитывая длительную персистенцию H-2d-специфичных Tregs в ранее описанном эксперименте, авторы исследовали возможность влияния этого явления на динамику отторжения аллогенных кожных трансплантатов. Сублетально облученным мышам B6 (H-2b) одновременно вводили клетки костного мозга мышей DBA/2 (H-2d) и H-2d-специфичные Tregs. Через три недели после восстановления кроветворения проводилась трансплантация кожных лоскутов от мышей DBA/2 (H-2d). В течение всего периода наблюдения (100 сут., а в отдельных сериях — 250 сут.) не было обнаружено каких-либо макроскопических признаков отторжения кожного трансплантата, причем полученный эффект не зависел от степени гемопозитического химеризма. Однако, при гистологическом исследовании пересаженных лоскутов кожи во всех случаях была обнаружена выраженная инфильтрация тканей эозинофилами и макрофагами. Это свидетельствует о том, что описанная методика не предотвращает

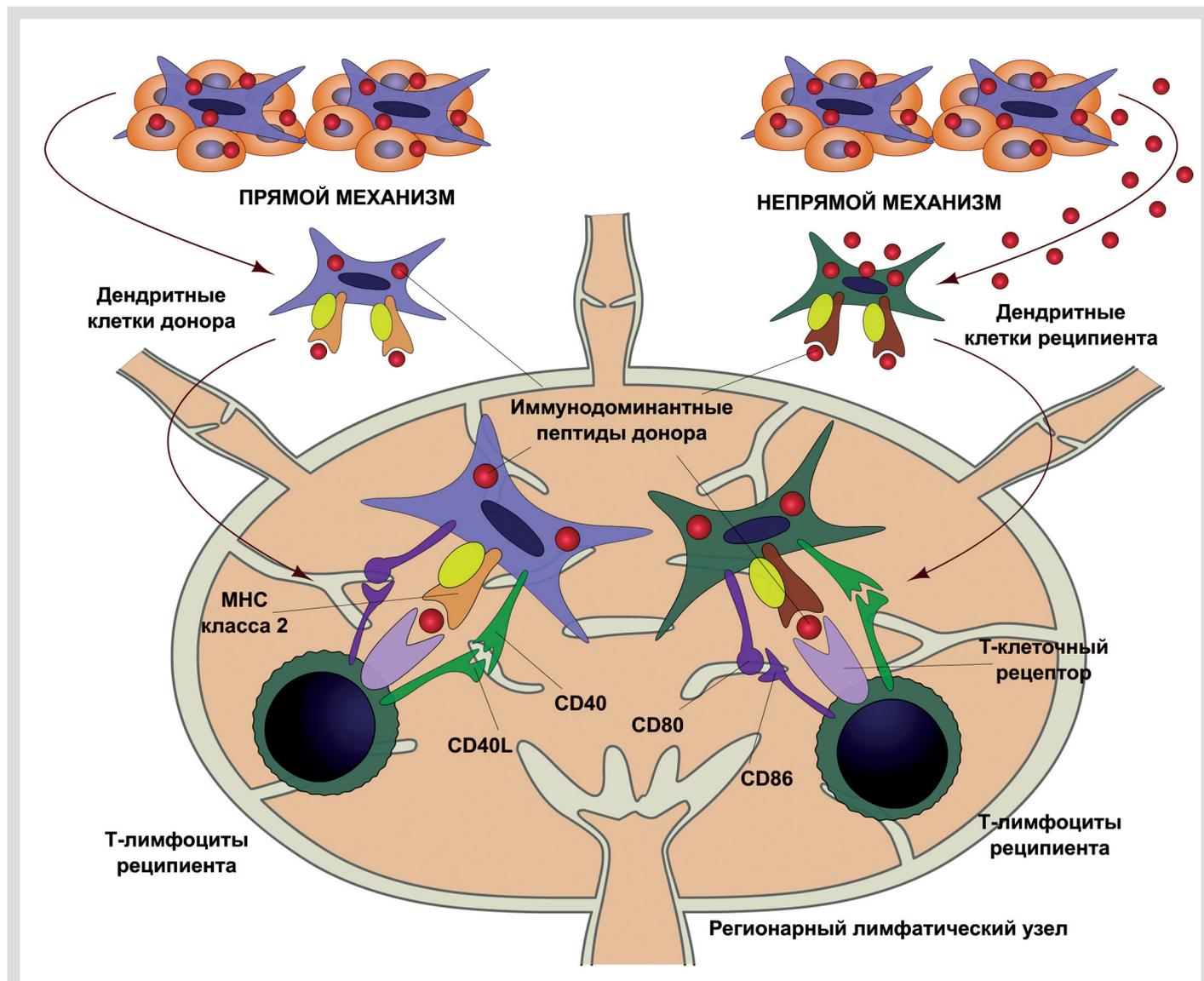
хронического отторжения и, следовательно, вряд ли применима в клинике.

Хроническое отторжение трансплантата обусловлено, главным образом, антигенами минорного комплекса гистосовместимости (МКГ), которые презентуются Т-лимфоцитам в комплексе с МНС реципиента (рис.). Используемые в работе H-2d-специфичные Tregs распознают антигены только в комплексе с H-2d и, следовательно, не могут предотвратить аллоиммунные реакции, связанные с распознаванием Т-лимфоцитами реципиента комплексов антигенов МКГ с собственными молекулами МНС II (H-2b). Авторы предположили, что использование Tregs, специфично распознающих комплексы аллоантигенов МКГ с H-2b, может предотвратить хроническое отторжение.

Для проверки этой гипотезы, Tregs мышей линии B6 (H-2b) культивировались с АПК мышей F1, полученных путем скрещивания мышей линий DBA/2 (H-2d) и B6 (H-2b). Так как молекулы МНС наследуются кодоми-

нантно, АПК мышей F1 (DBA/2ЧВ6) экспрессировали как H-2d, так и H-2b. Следовательно, при культивировании Tregs мышей B6 (H-2b) с АПК мышей F1 (DBA/2ЧВ6) экспансии подвергались Tregs, специфично распознающие как комплексы антиген – H-2d (H-2d-специфичные Tregs), так и комплексы антигены МКГ мышей DBA/2 – H-2b (МКГ-DBA/2-специфичные Tregs).

Сублетально облученным мышам B6 (H-2b) одновременно вводили клетки костного мозга мышей DBA/2 (H-2d) и аутогенные Tregs, предварительно культивированные с АПК F1 (DBA/2ЧВ6) мышей. После восстановления кроветворения проводилась трансплантация кожных лоскутов от мышей DBA/2 (H-2d). В течение всего периода наблюдения не было обнаружено каких-либо макроскопических признаков отторжения кожного трансплантата, также как не было выявлено инфильтрации тканей макрофагами и эозинофилами при гистологическом исследовании. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с трансплантацией сердца.



Механизмы прямого и непрямого распознавания аллоантигенов. В основе прямого механизма лежит миграция АПК донора из трансплантата в регионарные лимфатические узлы реципиента, где экспрессируемые на их поверхности комплексы молекула МНС II–пептид распознаются Т-лимфоцитами. При непрямом распознавании АПК реципиента поглощают антигены минорного комплекса гистосовместимости, источником которых служат клетки трансплантата. Затем АПК опять же мигрируют в регионарные лимфатические узлы и презентуют антигены с собственными молекулами МНС II

В случае использования только H-2d-специфичных Tregs пересаженные сердца сокращались весь период наблюдения, однако при гистологическом исследовании выявлялись признаки умеренного или тяжелого хронического отторжения в виде выраженной диффузной инфильтрации макрофагами и эозинофилами, деструкции кардиомиоцитов, утолщения интимы, артериосклероза и больших областей фиброза. Напротив, введение аутогенных Tregs, предварительно культивированных с F1 (DBA/2ЧВ6) АПК, предотвращало все признаки хронического отторжения.

Авторы показали, что эффекты введения Tregs во всех случаях не являются результатом неспецифической иммуносупрессии. В описанных экспериментах замена трансплантатов кожи или сердца мышей линии DBA/2 (H-2d) на аналогичные трансплантаты мышей линии SJL (H-2s) всегда приводила к реакции острого отторжения трансплантата.

Данные всех исследований были воспроизведены и подтверждены и для других комбинаций линий мышей с экспрессией разных молекул MHC II.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Coulombe M., Yang H., Wolf L., Gill R. Tolerance to antigen-presenting cell-depleted islet allografts is CD4 T cell dependent. *J. Immunol.* 1999; 162: 2503–10.
2. Sykes M. Mechanisms of tolerance induced via mixed chimerism. *Front. Biosci.* 2007; 12: 2922–34.
3. Roncarolo M.-G., Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 585–98.
4. Morelli A., Thomson A. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 610–21.
5. Sakaguchi, S., Ono M., Setoguchi R. et al. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 2006; 212, 8–27.

Таким образом, в работе было показано, что CD4⁺CD25⁺Foxp3 регуляторные лимфоциты, при подходящей стимуляции и экспансии *in vitro*, могут быть успешно использованы для индукции иммунологической толерантности к клеткам костного мозга и последующим аллотрансплантатам кожи и сердца у мышей, подвергнутых предварительному облучению. Предотвращение отторжения, вероятно, обусловлено супрессией аллоспецифичных T-лимфоцитов вводимыми Tregs. Остается неясным значение химерного гемопоэтического статуса. С одной стороны его роль может ограничиваться обеспечением важной для выживания Tregs антиген-специфической стимуляцией. С другой — дифференцирующиеся гемопоэтические клетки могут самостоятельно участвовать в индукции центральной и периферической иммунологической толерантности [2].

Использованный в исследовании режим кондиционирования имеет приемлемую для клинического применения токсичность. Авторы считают, что после адаптации протокол может быть использован для индукции специфической иммунологической толерантности у людей.

6. Belkaid Y., Blank, R., Suffa I. Natural regulatory T-cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* 2006; 212: 287–300.
7. Rouse B., Sarangi P., Suvas S. Regulatory T-cells in virus infections. *Immunol. Rev.* 2006; 212: 272–86.
8. Aluvihare V., Kallikourdis M., Betz A. Regulatory T-cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 266–71.
9. Beyer M., Schultze J. Regulatory T-cells in cancer. *Blood* 2006; 108: 804–11.
10. Bluestone J., Thomson A., Shevach E., Weiner H. What does the future hold for cell-based tolerogenic therapy? *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 650–4.
11. Joffre O., Gorsse T., Romagnoli P., Hudrisier D., van Meerwijk J. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes. *Blood* 2004; 103: 4216–21.

Подготовил В.С. Сергеев

По материалам: Joffre O., Santolaria T., Calise D. et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T-lymphocytes. *Nat. Med.* 2008; 14: 88–92

Репрограммирование панкреатических экзокриноцитов в функционально-активные β-клетки

Сахарный диабет (СД) 1-го типа (называемый также инсулинзависимым СД) — наиболее частое заболевание эндокринной системы человека, и наряду с онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями — одна из главных проблем здравоохранения во всем мире. В основе патогенеза СД 1-го типа лежит аутоиммунная атака секретирующих инсулин β-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы (ПЖ), что приводит к гибели последних и прогрессирующей недостаточности инсулина. До недавнего времени постоянные инъекции инсулина с контролем глюкозы крови и гликогемоглобина были единственным способом компенсации СД 1. Разработанный в конце 90-х годов и прошедший к 2006 году первые клинические испытания Эдмонтоновский протокол аллогенной трансплантации островковых клеток для лечения лабильного («brittle-type») СД 1 с частыми эпизодами гипогликемии открыл новую страницу

в истории СД, дав миллионам пациентов надежду на адекватную компенсацию без необходимости постоянных инъекций инсулина [1, 2]. Однако в используемых на настоящий момент вариантах данного протокола лишь менее половины пациентов сохраняют независимость от инсулина через год после трансплантации. Помимо этого, подобное лечение связано с необходимостью пожизненной иммуносупрессивной терапии для предотвращения алло- (реакция «хозяин против трансплантата») и аутоиммунного (продолжающаяся эндогенная аутоиммунная атака) отторжения трансплантированных β-клеток. Поэтому число работ, посвященных разработке новых методов лечения СД 1, неуклонно увеличивается.

Одним из потенциальных способов лечения различных заболеваний, связанных с утратой клеток определенного генеза (в частности, СД 1) является «репрограммирование» дифференцированных, присутствующих

в больших количествах клеток взрослого организма в плюрипотентные стволовые клетки с последующей их дифференцировкой в клетки с необходимым фенотипом, в случае СД 1 – в продуцирующие инсулин β -клетки. Альтернативой подобному подходу является прямое репрограммирование одного типа дифференцированных клеток в другой. Авторам опубликованной в Nature статьи «*In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells» при помощи аденовирусной доставки генов трех транскрипционных факторов, специфичных для β -клеток, удалось добиться *in vivo* конверсии зрелых экзокринных клеток ПЖ в полностью функциональные, инсулин-продуцирующие β -клетки. Для репрограммирования были выбраны экзокринные клетки ПЖ, поскольку их объединяет с β -клетками общий энтодермальный предшественник [3], а также в связи с тем, что при культивировании экзокринных клеток *in vitro* эндокринная программа «включается» в них спонтанно [4, 5]. Помимо этого, было показано, что аденовирусные векторы преимущественно инфицируют именно экзокринные клетки [6], и поскольку большая часть естественных β -клеток находится внутри островков Лангерганса, любые β -клетки, образовавшиеся *de novo*, могут быть легко идентифицированы при иммунофлуоресцентном анализе тканевых срезов как инсулин-позитивные клетки вне островков Лангерганса.

В ранее опубликованных работах той же группы при помощи *in situ* гибридизации был проведен скрининг более 1100 транскрипционных факторов, что позволило идентифицировать группы транскрипционных факторов, специфично экспрессирующихся в различных типах клеток эмбриональной ПЖ [7]. В частности, была идентифицирована группа, состоящая по меньшей мере из 20 транскрипционных факторов, экспрессия которых в эмбриональной поджелудочной железе ограничена β -клетками и/или их эндокринными предшественниками. Для дальнейшего анализа были выбраны 9 транскрипционных факторов (Pdx1, Ngn3, NeuroD, Nkx2.2, Nkx6.1, Pax4, Pax6, Isl1 и MafA), поскольку только соответствующие мутантные гены демонстрировали фенотип, связанный с развитием β -клеток [8, 9].

В ходе первоначальных экспериментов, смесь из 9 аденовирусных бицистронных векторов (M9), каждый из которых содержит разделенные IRES-элементом индивидуальный транскрипционный фактор и GFP, слитый с сигналом ядерной локализации (nGFP), транскутанно вводили в поджелудочные железы двухмесячных иммунодефицитных RAG-нокаутных мышей. Через месяц после инъекции умеренное повышение содержания неостровковых инсулин-позитивных β -клеток наблюдали в поджелудочных железах двух из трех инфицированных животных. Для определения минимального набора транскрипционных факторов, необходимых для конверсии экзокринных клеток в β -клетки, из пула аденовирусных векторов удаляли по одному вектору, и полученные смеси 8 векторов снова вводили в поджелудочные железы животных. Было показано, что удаление векторов, кодирующих Nkx2.2, Nkx6.1 или Pax4 не оказывает существенного влияния на продукцию не-островковых β -клеток. Данные, полученные при удалении каждого из остальных векторов, были слабоинтерпретируемыми. Смесь этих шести векторов (M6) авторы подвергли второму раунду поочередной деплеции составляющих, в результате чего было выяснено, что абсолютно необходимыми для конверсии инфицированных nGFP-позитивных экзокринных клеток в инсулин-позитивные β -клетки являются три транскрипционных фактора – Ngn3, MafA и

Pdx1 (смесь M3): удаление каждого из соответствующих векторов из пула M6 приводило к снижению процента инсулин-позитивных клеток среди инфицированных nGFP-позитивных клеток к уровню, наблюдаемому при инфицировании животных контрольным вектором, кодирующим только nGFP. Напротив, удаление векторов, кодирующих Pax6 и Isl1, не приводило к снижению процента генерированных *de novo* β -клеток к общему числу клеток, инфицированных смесью векторов. Удаление вектора, кодирующего NeuroD, умеренно снижало процент инсулин-позитивных клеток, а замена Ngn3 на NeuroD в смеси M3 приводила к получению смеси, статистически значимо отличающейся от контроля по эффективности генерирования инсулин-позитивных клеток, однако намного менее эффективной, чем изначальная смесь M3.

Репрограммирующий эффект M3, по-видимому, достаточно специфичен для экзокринных клеток ПЖ, поскольку эффективное (коэкспрессия всех трех факторов) инфицирование этой смесью тканей скелетных мышц *in vivo* и фибробластов *in vitro* не приводило к появлению инсулин-позитивных клеток. Происхождение генерированных β -клеток из экзокринных клеток ПЖ было подтверждено двумя способами. Так, было показано, что >95% инфицированных контрольным вектором клеток ПЖ коэкспрессируют nGFP и амилазу (маркер экзокринных клеток), в то время как клетки, коэкспрессирующие nGFP и маркеры других типов клеток, в норме присутствующих в ПЖ, суммарно составляли менее 5% инфицированных nGFP-позитивных клеток.

Прямое доказательство происхождения генерированных β -клеток из экзокринных клеток ПЖ было получено с использованием генетического подхода. Гомозиготных мышей линии Cpa1CreERT2 [7], под действием Тамоксифена индуцибельно экспрессирующих Cre-рекомбиназу селективно в экзокринных клетках ПЖ, скрещивали с гомозиготными мышами репортерной линии R26R, в которых ген LacZ, кодирующий β -галактозидазу, встроены в убиквитарно экспрессируемый локус ROSA26 и отделен от промоторной области стоп-кассетой, фланкированной loxP-сайтами. После введения в полученных «двойных» гетерозиготных мышей тамоксифена, экспрессируемая только в экзокринных клетках Cre-рекомбиназа вырезала фланкированную loxP-сайтами стоп-кассету перед LacZ, приводя к селективной экспрессии β -галактозидазы в 5–10% экзокринных клеток их потомства. Последующая инъекция M3 приводила к появлению множества клеток, коэкспрессирующих β -галактозидазу и инсулин, что однозначно подтверждает происхождение генерированных β -клеток из экзокринных клеток ПЖ.

Полученные инсулин-продуцирующие клетки демонстрировали все морфологические признаки β -клеток как *in situ* в тканевых срезах, так и при диссоциации в культуре. Иммунофлуоресцентный анализ продемонстрировал экспрессию всех основных генов, продукты которых вовлечены в функционирование β -клеток (Glut2, GSK, Pcsk1), а также ключевых β -клеточных транскрипционных факторов (NeuroD, Nkx2.2 и Nkx6.1). Индуцированные β -клетки не экспрессировали маркеров, специфичных для других типов клеток ПЖ, в том числе других гормонов ПЖ. По данным сравнительного анализа экспрессионного профиля nGFP-позитивных клеток мышей, инфицированных M3, и клеток островков Лангерганса тех же мышей, количество транскриптов, сверхэкспрессированных в этих клеточных популяциях по сравнению с не-островковыми GFP-негативными клетками, составило

2051 и 2060 соответственно, из них число транскриптов, перекрывающихся между этими двумя популяциями, составило 1501, т.е. более 70%.

Также было показано, что, как и естественные β -клетки, индуцированные инсулинпозитивные клетки вызывают локальное ремоделирование васкулярной сети для облегчения высвобождения инсулина в кровь. Подобно естественным β -клеткам, индуцированные инсулинпозитивные клетки экспрессируют VEGF и через 10 и 30 сут. после инфекции M3, периваскулярное расположение демонстрировали 61% и 83% индуцированных nGFP-положительных клеток, в то время как при инфекции контрольным вектором этот показатель составил 32%.

Эффективность индуцированных β -клеток в отношении секреции инсулина в кровь была показана с использованием индукции диабета при помощи специфической абляции естественных β -клеток стрептозотоцином (STZ) с последующей (спустя неделю после инъекции STZ) инфекцией животных смесью векторов M3. С момента инфицирования животных M3 или контрольным вектором, уровень глюкозы крови (натошак) у мышей, получавших M3, был значительно ниже по сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор с nGFP, причем этот эффект был стабилен даже через 9 нед. после инъекции стрептозотоцина. По сравнению с мышами, получавшими контрольный вектор, животные, получавшие M3, демонстрировали бульшую толерантность к глюкозе и более высокие сывороточные уровни инсулина. Таким образом, генерированные *de novo* инсулинпозитивные клетки являются полноценными функциональными β -клетками.

Важным результатом является также то, что, индуцирующие β -клеточную программу факторы необходимы и присутствуют в инфицированных клетках лишь временно. Так, при помощи RT-PCR анализа экспрессии вирусных трансгенов (по одному прямому праймеру на каждый из трех трансгенов и один и тот же обратный праймер, специфичный к IRES-элементу) было показано, что экспрессия всех трех трансгенов в поджелудочных железах экспериментальных животных значительно снижена через 2 месяца после инфекции и не детектируется через 2 мес. после инфекции. Иммунофлуоресцентный анализ продемонстрировал отсутствие экспрессии белкового продукта Ngn3 в индуцированных β -клетках через месяц после инфекции, однако экспрессия Pdx1 и MafA оставалась по-прежнему выраженной, что с учетом данных RT-PCR – анализа (см. выше) указывает на активацию эндогенных генов. Важно отметить, что эти данные находятся в согласии с тем фактом, что зрелые дифференцированные β -клетки не экспрессируют Ngn3, однако экспрессируют Pdx1 и MafA [8, 9], т.е. Ngn3 необходим для индукции трансдифференцировки, но не для поддержания β -клеточного фенотипа.

Главными достоинствами данного исследования по сравнению с предыдущими попытками репрограммирования дифференцированных клеток (гепатоциты [10–13], экзокринные клетки ПЖ [14–17], эпителий протока ПЖ [19, 20]) в β -клетки являются исчерпывающие и мульти-

модальные (микроскопия, иммуногистохимия, RT-PCR, экспрессионный профиль) доказательства «чистой» β -клеточной природы репрограммированных клеток, тогда как в большинстве других исследований репрограммирование было либо явно частичным (экспрессия некоторых β -клеточных генов, но отсутствие морфологических и фенотипических признаков, характерных для β -клеток), либо проведенный анализ не исключал гибридного фенотипа.

В то же время, по данным других авторов, для «включения» β -клеточной программы в экзокринных клетках *in vitro*, по-видимому, достаточно простой диссоциации в культуре [14–17]. Механизм этого эффекта неясен, а часть получаемых таким образом β -клеток демонстрирует гибридный фенотип, экспрессируя маркеры экзокринных клеток ПЖ, однако полученные β -клетки продуцируют инсулин и эффективно восстанавливают нормогликемию в модели аллоксан-индуцированного диабета. Поэтому на данном этапе исследований, при всей ценности данной работы в качестве «proof-of-principle»-исследования, демонстрирующего конверсию дифференцированных экзокринных клеток ПЖ в полностью функциональные и стабильные *in vivo* β -клетки при помощи транзитной коэкспрессии всего трех транскрипционных факторов, потенциальные практические преимущества подобного подхода перед простой диссоциацией экзокринных клеток ПЖ в культуре пока не вполне ясны. В любом случае, помимо своей академической ценности, данная работа привнесла в арсенал потенциальных способов лечения СД 1 типа еще одну интересную модальность.

Проблемой, связанной с потенциальным практическим применением как описанного Q. Zhou с соавт., так и других подобных способов лечения СД 1 типа, является дальнейшая судьба трансплантированных β -клеток. В отличие, например, от инфаркта миокарда, при котором поражение ткани носит одномоментный характер, и генерированным подобным образом кардиомиоцитам может угрожать только следующий инфаркт, СД 1 типа – хроническое аутоиммунное заболевание, и генерированные *in vitro* β -клеток неизбежно постигнет та же участь, что ранее постигла естественные β -клетки. Поэтому несмотря на «пациент-специфичность» подобных подходов, вопрос посттрансплантационной иммуносупрессии стоит столь же остро, как и в Эдмонтоновском протоколе, с той лишь разницей, что во втором случае на первый план выходит коррекция аллоиммунной реакции «хозяин против трансплантата». Одними из наиболее перспективных способов иммунокоррекции в подобных случаях являются различные протоколы аутотрансплантации/индукции/увеличения пула циркулирующих регуляторных Т-лимфоцитов. Вполне возможно, что именно сочетание двух параллельных протоколов клеточной терапии, один из которых направлен на восстановление β -клеток, а другой – на коррекцию иммунологических нарушений, лежащих в основе аутоиммунной атаки островковых клеток ПЖ, являются наиболее перспективными и оптимальными для этиотропного и патогенетического лечения СД 1 типа.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Shapiro A.M., Ricordi C., Hering B.J. et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. N. Engl. J. Med. 2006; 355(13): 1318-30.
2. Srinivasan P., Huang G.C., Amiel S.A. et al. Islet cell transplantation. Postgrad. Med. J. 2007; 83(978): 224-9.
3. Gu G., Dubauskaite J., Melton D.A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from

duct progenitors. Development 2002; 129(10): 2447-57.

4. Baeyens L., De Breuck S., Lardon J. et al. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. Diabetologia 2005; 48(1): 49-57.

5. Minami K., Okuno M., Miyawaki K. et al. Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. PNAS 2005; 102(42): 15116-21.

6. Wang A.Y., Peng P.D., Ehrhardt A. et al. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther.* 2004; 15(4): 405-13.
7. Zhou Q, Law AC, Rajagopal J et al. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev. Cell.* 2007; 13(1):103-14.
8. Murtaugh L.C., Melton D.A. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003; 19: 71-89
9. Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn.* 2004; 229(1): 176-200.
10. Wang A. Y., Ehrhardt A., Xu H. et al. Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using Pdx-1 or Neurogenin-3 in the liver. *Mol. Ther.* 2007; 15(2): 255-63.
11. Ferber S., Halkin A., Cohen H. et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nature Med.* 2000; 6(5): 568-72.
12. Kaneto H., Nakatani Y., Miyatsuka T. et al. PDX-1/VP16 fusion protein, together with NeuroD or Ngn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. *Diabetes* 2005; 54(4): 1009-22.
13. Miyatsuka T., Kaneto H., Kajimoto Y. et al. Ectopically expressed PDX-1 in liver initiates endocrine and exocrine pancreas differentiation but causes dysmorphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 310(3): 1017-25.
14. Baeyens L., De Breuck S., Lardon J. et al. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* 2005; 48(1): 49-57.
15. Minami K., Okuno M., Miyawaki K. et al. Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. *PNAS* 2005; 102(42): 15116-21.
16. Minami K., Seino S. Pancreatic acinar-to-beta cell transdifferentiation in vitro. *Front. Biosci.* 2008; 13: 5824-37.
17. Okuno M., Minami K., Okumachi A. et al. Generation of insulin-secreting cells from pancreatic acinar cells of animal models of type 1 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007; 292(1): E158-E165.
18. Sapir T., Shternhall K., Meivar-Levy I. et al. Cell-replacement therapy for diabetes: generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *PNAS* 2005; 102: 7964-9.
19. Heremans Y., Van De Casteele M., in't Veld P. et al. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J. Cell Biol.* 2002; 159(2): 303-12.
20. Gasa R., Mrejen C., Leachman N. et al. Proendocrine genes coordinate the pancreatic islet differentiation program in vitro. *PNAS* 2004; 101(36): 13245-50.

Подготовил П.В. Белоусов

По материалам: Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D. *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells.* *Nature* 2008; 455: 627-32

«Мезенхимальный резерв» – новые данные или «хорошо забытое старое»?

С развитием клеточных технологий все большее число исследователей занимается вопросами биологии, культивирования, экспериментального и клинического применения постнатальных стволовых клеток. Об этой тенденции свидетельствует интенсивный рост количества публикаций, связанных с биотехнологическим направлением. При этом ключевую позицию занимают исследования мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК), что обусловлено доступностью методик их получения, экспансии *in vitro* и наличием ряда специфических полезных свойств [1]. Помимо способности к дифференцировке в нескольких ортодоксальных направлениях, ММСК принимают участие в регуляции иммунного ответа [2].

Несмотря на наличие отработанных методик культивирования и анализа ММСК *in vitro*, остается актуальным вопрос о естественной локализации этих клеток в организме. Как метко отмечают Е.Б. Владимирская с соавт., «биология мезенхимальных стволовых клеток в настоящее время остается биологией вне окружения» [3]. Иными словами, до настоящего времени в должной степени не охарактеризована специфическая тканевая ниша ММСК, однако клетки, со свойствами ММСК получены из многих тканей и органов. Основными источниками ММСК являются красный костный мозг [4] и жировая ткань [5], хотя эти клетки выделены также из печени, селезенки, почек, поджелудочной железы [6], синовиальных оболочек [7], легких [8], кожи [9]. Это отличает их, например, от гемопоэтических стволовых клеток, локализирующихся в специфических костномозговых нишах. Можно ли утверждать, что ММСК рассредоточены («рассредоточенный камбий») по разным тканям, где ассоциированы с индивидуальным микро-

окружением, или же это клетки, эмигрирующие из единого места своей локализации, например из костного мозга? Ясно одно – обнаружение специфических тканевых ниш ММСК *in vivo* открыло бы путь для более детального изучения свойств этих клеток в своей естественной, физиологической среде, уточнило их функции и дальнейшее практическое применение.

В этой связи, М. Crisan с соавт. в журнале *Cell Stem Cell* опубликовали результаты исследования, в котором постулировали расположение ММСК в специфических «периваскулярных» нишах. Для доказательства этого положения авторы показали, что перициты (также некорректно называемые ими периваскулярными клетками), полученные из стенок сосудов различных органов и тканей, по ряду основных параметров соответствовали ММСК. В частности, были показаны способность перицитов к лейомиогенезу, остеобластический, хондробластический и адипоцитарный дифференцировочный потенциал. Кроме того, исследователи установили соответствие на уровне иммунофенотипа и особенностей хемотаксиса.

Аналогичная гипотеза была выдвинута в работе Meirelles L. da Silva с соавт., фактически одновременно опубликованной в журнале *Stem Cells*, центральным постулатом которой являлось положение, в соответствии с которым ММСК во всем организме имеют периваскулярную локализацию, являясь, по меньшей мере, одной из субпопуляций перицитов. Основные усилия для доказательства своей гипотезы авторы направили на определение иммунофенотипических и морфофункциональных соответствий между перицитами и ММСК с привлечением материалов других исследовательских лабораторий.

Перициты (клетки Руже), составляющие особую линию дивергентного развития периваскулярных клеток [10], представляют собой соединительнотканые отростчатые клетки, расположенные в расщеплениях базальной мембраны эндотелия сосудов микроциркуляторного русла [11–14]. Основными характеристиками перицитов являются: наличие щелевых или плотных контактов с эндотелиоцитами, продукция хотя бы одного из специфических маркеров (ганглиозиды, определяющиеся 3G5-антителами; нестин в сочетании с α -SMA, нейроглиальный антиген 2) и отсутствие экспрессии панэндотелиальных клеточных маркеров [15]. По мнению большинства авторов, перициты — высокоспециализированные клетки, выполняющие ряд значимых функций: регуляция тонуса сосудов за счет наличия актин-миозиновых микрофиламентов и нейроперицитарных синапсов; опорная функция; синтез основных компонентов базальной мембраны; контроль пролиферативной активности эндотелиоцитов, митотическое деление которых прекращается при формировании контактов с перицитами [12, 16]. Ряд авторов определяет перициты как малодифференцированные клетки, однако в большинстве случаев — из-за отождествления их с периваскулоцитами [17, 18].

В то же время, показана роль перицитов в качестве предшественников фибробластов и гладкомышечных клеток [13, 19], что вызывает дополнительные споры относительно их положения в системе дифференциальной организации. Более того, в своей работе Meirelles L. da Silva с соавт. приводят данные относительно способности перицитов к дифференцировке в остеобластическом, хондробластическом [20] и адипоцитарном [21] направлениях, адгезии к поверхности культурального пластика, что в сумме с экспрессией CD105 и CD90 [22] соответствует специфическим характеристикам ММСК.

Исследователи отмечают не только морфологические, но и функциональные сходства перицитов и ММСК. В частности, перициты также способны поддерживать гемопоз, так как первые очаги кроветворения в длинных трубчатых костях выявляются после появления перицитов в стенке капилляров, врастающих в замещающийся костной тканью хрящ [23].

В контексте экспериментальных данных, указывающих на соответствие перицитов и ММСК, было предложено обозначать место локализации последних как «периваскулярная ниша», хотя в данном случае более корректным было бы употребление определения — «перизэндотелиальные» или «субэндотелиальные». При этом исследователи отмечают, что перициты с полной уверенностью могут считаться ММСК только после высвобождения их из сосудистой стенки, то есть после потери межклеточных контактов с эндотелиоцитами, являющихся специфическим критерием перицитов. В соответствии с этой моделью, первичным индуктором пролиферации и дифференцировки ММСК является именно утрата контакта с эндотелием и базальной мембраной, что наблюдается при повреждении ткани. При этом наряду с восполнением клеточного состава, непосредственно в зоне дефекта высвободившиеся клетки продуцируют цитокины, реализующие иммуносупрессивный эффект.

Важно отметить, что вопрос о близкой морфофункциональной связи ММСК и сосудов микроциркуляторного русла уже давно обсуждается в научном мире.

В частности, еще в 1926 г. выдающийся отечественный гистолог А.А. Максимов отмечал, что в соединительной ткани взрослого организма на протяжении всей жизни сохраняются малодифференцированные клетки, локализуемые вокруг мелких сосудов и приближающиеся по своей плюрипотентности к клеткам эмбриональной мезенхимы [24]. К «мезенхиме взрослого» А.А. Максимов относил также и перициты. Его исследования послужили основой для формирования теории «мезенхимального резерва», поддержанной и дополненной впоследствии многими исследователями [11, 12, 25, 26]. В дальнейшем было установлено, что периваскулярные клетки способны к дифференцировке в остео- и хондробластическом направлениях [11, 12].

Зачастую, в литературных источниках прослеживается некоторая путаница в определении и употреблении понятий, обозначающих соединительнотканые клеточные элементы, сопровождающие сосуды. Так, «периваскулоциты» приравнивают к адвентициальным клеткам [11], а также путают с перицитами [17, 18]. При этом допустимо отождествление адвентициальных и периваскулярных клеток при их локализации в адвентициальной оболочке, характерной для сосудов крупного калибра [19]. Перициты же вообще отдельный вид клеток. Большинство авторов они рассматриваются как высоко дифференцированные клетки, но исследования последних лет [15, 20, 21] ставят это представление под сомнение.

Таким образом, теория «мезенхимального резерва» получила рациональное обоснование в работах M. Crisan и Meirelles L. da Silva с соавт. Значимость её роли трудно переоценить, так как она открывает широкие перспективы для дальнейшей детализации биологии стволовых клеток и использовании знаний на практике. Вызывает недоумение, однако, что авторы в своих работах не только ни разу не упомянули о теории «мезенхимального резерва» и её основоположнике, но, более того, посчитали открытие перизэндотелиальных ниш ММСК полностью своим приоритетом.

Представляется возможным, что в свете исследований последних пяти лет, состав «мезенхимального резерва» может быть расширен за счет данных, полученных, главным образом, в лаборатории С. Verfaillie. В частности, из костного мозга лабораторных животных и человека были выделены плюрипотентные клетки (Oct4⁺Rex-1⁺), названные исследователями прогениторными мультипотентными клетками взрослых (multipotent adult progenitor cells, MAPC), способные к дифференцировке в мезодермальные, нейроэктодермальные и эндодермальные клеточные типы, не экспрессирующие CD44, CD45, CD117, MCH I и II класса, не теряющие плюрипотентного статуса после 50–70 пассажей в культуре [27]. Клетки, после инъекции в бластоцисту, включались в нормально протекающий процесс эмбриогенеза химер [27]. Учитывая возможность повсеместной перизэндотелиальной локализации ММСК и присоединения MAPC к ним при получении ММСК из костного мозга, можно сделать вывод о близкой локализации этих клеточных типов и, возможно, расположении MAPC также в стенке сосудов микроциркуляторного русла. В любом случае, с открытием MAPC название теории, предложенной А.А. Максимовым, представляется не таким уж и некорректным в методологическом и фактическом отношении, вопреки распространенному мнению, приведенному в БМЭ [29].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5): 393–5.
2. Krampfer M., Pasini A., Pizzolo G. et al. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; 6(4): 435–41.
3. Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцев А.Г. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. М.: ИД Медпрактика-М. 2005. С. 75
4. Friedenstein A.J., Ivanov-Smolenski A.A., Chajlakjan R.K. et al. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiohimeras and heterotopic transplantats. *Exp. Hematol.* 1978; 6: 440–4.
5. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7: 211–28.
6. da Silva M.L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 2006; 119: 2204–13.
7. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1928–42.
8. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005; 85: 962–71.
9. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3: 778–84.
10. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе. Киев: Наук. Думка. 1989; 192 с.
11. Гололобов В.Г. Регенерация костной ткани при заживлении огнестрельных переломов. СПб.: «Петербург-XXI век» 1997; 160 с.
12. Данилов Р.К. Руководство по гистологии. В 2Т. Т. II. СПб.: СпецЛит, 2001; 733 с.
13. Hirschi K.K., D'Amore P.A. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* 1996; 32: 687–98.
14. Andreeva E.R., Pugach I.M., Gordon D. et al. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell* 1998; 30: 127–35.
15. da Silva L.M., Caplan A.I., Nardi N.B. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2008; 26(9): 2287–99. [Full Text]
16. Шахламов В.А. Капилляры. М.: Медицина 1971. — 198 с.
17. Михайлов Л.Н., Пальцин А.А. К вопросу об остеогенных клетках-предшественниках при репаративном остеогенезе. Бюл. эксперим. биологии и медицины 1986; 101 (6): 755–7.
18. Хэм А., Кормак Д. Гистология. М.: Мир 1983; 4: 60–1.
19. Ross R., Everett N.B., Tyler R. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J. Cell Biol.* 1970; 44(3): 645–54.
20. Brighton C.T., Hunt R.M. Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J. Orthop. Trauma* 1997; 11: 244–53.
21. Richardson R.L., Hausman G.J., Campion D.R. Response of pericytes to thermal lesion in the inguinal fat pad of 10-day-old rats. *Acta Anat. (Basel)* 1982; 114: 41–57.
22. Oishi K., Kamiyashiki T., Ito Y. Isometric contraction of microvascular pericytes from mouse brain parenchyma. *Microvasc Res.* 2007; 73: 20–28.
23. Charbord P., Tavian M., Humeau L. et al. Early ontogeny of the human marrow from long bones: An immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* 1996; 87: 4109–19.
24. Maximow A.A. Über undifferenziert Blutzellen und mesenchymalen Keimlager im erwachsenen Organismus. *Klin. Wochenschr.* 1926; 5(43): 2193–9.
25. Ясвоин Г.В. К сравнительной гистологии крови и соединительной ткани. О возникновении основного вещества кости у млекопитающих. *Арх. Биол. Наук* 1935; 35(3): 553–76.
26. Заварзин А.А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. М.; Л.; Медицина 1947; 2: 273 с.
27. Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T. et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 2002; 30(8): 896–904.
28. Crisan M., Yap S., Casteilla L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 301–13.
29. Михайлов. Мезенхима. Большая медицинская энциклопедия. Изд. 3-е. М.: Советская Энциклопедия. Т. 14, 1980: 496.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: da Silva L.M., Caplan A.I., Nardi N.B. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2008; 26(9): 2287–99. Crisan M., Yap S., Casteilla L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 301–13

Паравульнарные ткани – новый источник ММСК?

Применение достижений клеточных технологий в клинической практике возможно лишь при удовлетворении ряда требований, касающихся получения клеточного материала, безопасности и воспроизводимости результатов в клинической практике. В этой связи, активно исследуются методы и источники получения исходных клеточных популяций, их спецификации, особенности и свойства в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Несмотря на идентификацию сходных с ММСК клеток в различных тканях и органах [1], их выделение осуществляется главным образом из красного костного мозга и жировой ткани, где их количество наибольшее, а процедура получения достаточно безопасна. Однако возможность осуществления инвазивных манипуляций для выделения ММСК ограничена тяжестью состояния пациента, которому в дальнейшем будет необходима клеточная терапия. В частности, в случае тяжелых повреждений опорно-двигательного аппарата дополнительные травмирующие мероприятия, связанные с получением костного мозга или жировой ткани, становятся

неприемлемыми, выделение клеточного материала откладывается. Более того, экспериментально доказано, что костный мозг животных, перенесших политравму, содержит меньшее количество гемопоэтических стволовых клеток [2] чем в состоянии физиологической нормы; подобное обстоятельство связано с их мобилизацией из костного мозга при травме на периферию. С определённой уверенностью можно экстраполировать это и на численность ММСК. В этой связи, в сочетании с идентификацией и изучением источников ММСК продолжается разработка и совершенствование протоколов их получения.

В рамках этого направления особый интерес представляют недавно опубликованные в журнале *Bone and Joint Surgery* результаты исследования L.J. Nesti с соавт., нацеленные на использование в качестве источника ММСК тканей, удаляемых в процессе хирургической обработки ран.

В клиническом исследовании приняли участие 10 солдат армии США с ранами конечностей, в том числе и

множественными, полученными во время боевых действий в Ираке. Пострадавшие были доставлены в армейский медицинский центр Уолтера Рида (Вашингтон, США), на базе которого осуществлялась работа. В результате серийных хирургических обработок ран, нацеленных на удаление поврежденных «мягких тканей» и костных осколков из зон первичного и вторичного травматического некроза, был собран материал, использованный с согласия пациентов для дальнейших клеточных исследований.

Методика выделения клеток включала гомогенизацию мышечной ткани в культуральной посуде с добавлением DMEM, антибиотиков (пенициллин 300 Е/мл и стрептомицин 300 мг/мл) и фунгицида в высоких концентрациях для ликвидации микробного загрязнения. Затем материал помещался в среду, обладающую протеолитическими свойствами за счет наличия коллагеназы II типа в концентрации 0,5 мг/мл, где выдерживался в течение 2 час. После этапов фильтрации и центрифугирования клетки высевались на поверхность культуральной посуды. Особенности технологии инкубирования, на которые акцентировали внимание авторы, являлось промывание культуры раствором Хенкса непосредственно перед сменой среды для более быстрого очищения от неспособных к адгезии мононуклеаров, а также использование высоких концентраций антибиотиков и противогрибкового препарата, что, однако, не предотвратило потерю двух из двенадцати культур из-за микробной контаминации.

Исследователи подсчитали, что с одного грамма мышечной ткани было получено $7,1 \pm 6,4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток, из которых $26,4\% \pm 3,6\%$ адгезировались к поверхности культурального пластика, принимая удлинённую веретеновидную форму, и начали пролиферировать со второго дня инкубирования. Через две недели культура достигла 80–90% конfluence. На втором этапе исследования проводилась детальная спецификация культуры в соответствии с основными критериями ММСК [3]. Методом проточной цитометрии была показана экспрессия CD73, CD90 и CD105 в сочетании со сниженной продукцией CD45. Клетки были также позитивны по маркерам CD29, CD44, CD146, что соответствует иммунофенотипу ММСК. Кроме того, была показана способность полученных клеток к дифференцировке в трех ортодоксальных направлениях: остеобластическом, хондробластическом и адипоцитарном. При стимуляции остеогенеза наблюдалось повышение содержания щелочной фосфатазы в культуре и преципитация солей кальция. Доказательством хондрогенеза послужила идентификация гликозаминогликанов посредством окрашивания альциановым синим. При дифференцировке в адипоцитарном направлении определялось внутриклеточное накопление липидных капель.

Для более полного подтверждения дифференцировочных потенциалов полученных клеток исследователи методом ПЦР с обратной транскрипцией показали экспрессию ряда генов, специфичных для представителей каждого отдельного направления дифференцировки. Клетки при культивировании в остеоиндуктивной среде экспрессировали CBFA1/RUNX2 (core binding factor a1), а также гены, ответственные за синтез щелочной фосфатазы и остеокальцина. В адипоцитарной среде стимулировала экспрессию PPARg2 (peroxisome proliferator-activated receptor g2), LPL (lipoprotein lipase) и FABP4 (fatty acid binding protein 4). В хондрогенных условиях увеличивался уровень экспрессии SOX9 и генов, кодирующих синтез коллагена II типа и агрекана.

Важно отметить, что исследователи не первыми выделили стволовые клетки из поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани. Первые работы датируются концом 90-х, началом 2000-х. Тогда, главным образом, были описаны стволовые клетки, обладающие гемопоэтическими потенциальными и способностью к миогенной дифференцировке [4–6]. Некоторые авторы рассматривали их в качестве предшественников сателлитных клеток, коммитированных в рабдомиоцитарном направлении. В экспериментах на мышцах Qu-Petersen с соавт. (2002) описали CD34⁺/Sca-1⁺ клетки, обладающие высокой пролиферативной активностью и способные к дифференцировке в эндотелиальном и нейральном направлениях. A. Sacco (2008) с соавт. описали мышечные стволовые клетки (CD34⁺/integrin- α 7⁺), не экспрессирующие Sca-1 и характеризующиеся высоким уровнем экспансии *in vivo*. Было показано, что при трансплантации в скелетную мышечную ткань, лишённую сателлитных клеток, они занимали их клеточные ниши, активно пролиферировали и дифференцировались в Pax7⁺ мононуклеары, участвующие в миогенезе. Однако ни в одной из множества противоречивых работ, касающихся получения разнообразных клеток-предшественниц из поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани, ранее не была выполнена подробная спецификация полученных культур.

Таким образом, L.J. Nesti с соавт. впервые в клиническом исследовании описали получение стволовых клеток из травмированной скелетной мышечной ткани, доказали их принадлежность к популяции ММСК за счет установления способности к адгезии к поверхности культуральной посуды, характерного иммунофенотипа и дифференцировки в трех ортодоксальных направлениях. Основным нерешённым вопросом остались источники появления ММСК в поврежденных мышцах. Потенциально возможны несколько вариантов, частично указанных авторами работы. Во-первых, ММСК могли мигрировать в область поражения непосредственно из костного мозга поврежденных костей. Во-вторых, ММСК могут быть привнесены из кровеносного русла, где установлено наличие соответствующих им по ряду морфофункциональных свойств циркулирующих предшественников соединительных тканей [7, 8]. В-третьих, ММСК в виде периваскулоцитов, в соответствии с теорией «мезенхимального резерва», могут сопровождать мелкие сосуды [9], которыми богата мышечная ткань. К тому же некоторые свойства ММСК описаны и для сателлитных клеток, как то адгезия к поверхности культурального пластика, остео- и адипогенные потенциалы [10, 11], что могло служить основой для непроизвольного включения их в состав выделенной популяции ММСК. Установление источников появления ММСК в мышечной ткани имеет важное практическое значение. Если исследуемая популяция присутствовала в тканях травмированной конечности до ранения, то неизбежно в использованном для их получения материале эти клетки подверглись воздействию повреждающих факторов огнестрельного или минно-взрывного оружия, следовательно, находились в состоянии т. н. «молекулярного сотрясения», способного вызывать повреждения генетического аппарата клетки и запускать апоптоз. В этой связи в будущем необходим дополнительный и детальный анализ биологии этих клеток.

Кроме того, остается не совсем ясным, как авторам удалось при получении тканевого материала в поздние сроки от ранения (7 сут.) избежать попадания в культуру элементов грануляционной ткани, безусловно, богатой стволовыми клеточными элементами. Впрочем, эти

детали не снижают общего значения работы, как основополагающей в новом направлении — клеточных технологиях в практике военно-полевой хирургии. В частности, Министерством Обороны США создан Институт Регенеративной Медицины Вооруженных Сил с целью разработки методов лечения солдат с повреждениями конечностей с помощью клеточных технологий. Возникновение этой программы обусловлено увеличением доли минно-взрывных поражений и ранений конечностей в условиях последних военных компаний армии США, что увеличило необходимость восстановления обширных

участков конечностей у пострадавших. За правительственный грант в 250 млн \$ соперничают большое количество научных групп и лабораторий [12]. В этой связи, есть основания полагать, что работа L.J. Nesti с соавт. также связана с участием в данной программе.

В любом случае, исследователи выявили принципиально новый источник получения ММСК в условиях тяжелого состояния пациента с травмами костно-суставной системы, объединяющий хирургию и клеточные технологии в единый инструмент оказания адекватной, комплексной медицинской помощи.

ЛИТЕРАТУРА:

1. da Silva L.M., Caplan A.I., Nardi N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(9): 2287–99.
2. Александров В.Н., Сергеев В.С. Влияние тяжелой политравмы на миграцию стволовых кроветворных клеток у мышей. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2006; 2(4): 59–62.
3. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–7.
4. Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS* 1999; 96(25): 14482–6.
5. Kawada H., Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001; 98(7): 2008–13.
6. Seale P., Asakura A., Rudnicki M.A. The Potential of Muscle Stem Cells. *Developmental Cell* 2001; 1: 333–42.
7. Koerner J., Nestic D., Romero J.D. et al. Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow-Derived Mesenchymal

- Stem Cells. *Stem Cells* 2006; 24(6): 1613–19.
8. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S., et al. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 153(5): 1133–40.
9. Maximow A.A. Uber undifferenziert Blutzellen und mesenchymalen Keimlager im erwachsenen Organismus. *Klin. Wochenschr.* 1926; 5(43): 2193–9.
10. Teboul L., Gaillard D., Staccini L. et al. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J Biol. Chem.* 1995; 270: 28183–7.
11. Lee J.Y., Qu-Petersen Z., Cao B. et al. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing of myogenic satellite cells. *J. Cell Biol.* 2000; 150(5): 1085–100.
12. Coombs A. Stem cells drafted for war on wounds. *Nature Reports Stem Cells* published online: 13 November 2008
13. Sacco A., Doyonnas R., Kraft P. et al. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 2008; 456(7221): 502–6.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Nesti L.J., Jackson W.M., Shanti R.M. et al. Differentiation Potential of Multipotent Progenitor Cells Derived from War-Traumatized Muscle Tissue. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2008; 90: 2390–8

Получение iPS клеток без векторной интеграции

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают уникальной способностью к дифференцировке в любые клетки организма, что делает их привлекательным биотехнологическим объектом как для изучения фундаментальных вопросов биологии развития, так и для использования в клинической практике и фармакологии. Центральная задача, стоящая перед исследователями, заключается в разработке технологии рутинного получения ЭСК или ЭСК-подобных плюрипотентных клеток без разрушения бластоцисты — их первичного источника, а также без использования клеток человека, количество которых ограничено (например, ооцитов). До недавнего времени методики репрограммирования дифференцированных клеток не могли в полной мере удовлетворять этим двум условиям, поскольку источником факторов, требуемых для репрограммирования генома дифференцированной клетки, служила цитоплазма яйцеклеток либо других ЭСК [1]. Лишь благодаря обнаружению молекулярных факторов, ответственных за поддержание плюрипотентного статуса ЭСК (Oct4, Sox2, Nanog и др.), стала возможной направленная генетическая модификация дифференцированных клеток с целью репрограммирования их генома и возврата к плюрипотентному состоянию. Плюрипотентные клетки, полученные из мышечных фибробластов в результате ретровирусной трансфекции четырех генов — Oct4, Sox2, c-Myc и Klf4, японские ученые S. Yamanaka и K. Takahashi назва-

ли индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPS-клетками) [2], уже неоднократно обсуждались [3, 4]. Такие iPS-клетки, полученные из различных соматических клеток мышей и человека, по ряду принципиальных характеристик (эпигенетический статус, транскрипционный профиль, формирование тератом при трансплантации иммунодефицитным мышам, в случае мышечных iPS-клеток — введение в бластоцисту с последующим образованием животных-«химер») сходны с ЭСК, полученных из бластоцист. Обнаружение феномена репрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные как следствие относительно простых генетических модификаций стало одним из главных научных достижений 2007 г. [5] и получило широкий научный и общественный резонанс, хотя говорить об истинной ценности данной технологии для клинической практики пока рано. Одно из ключевых препятствий — использование вирусных векторов, интегрирующихся в клеточный геном, а также протоонкогенов в качестве трансгенов (c-Myc, Klf4), что может приводить к малигнизации iPS-клеток.

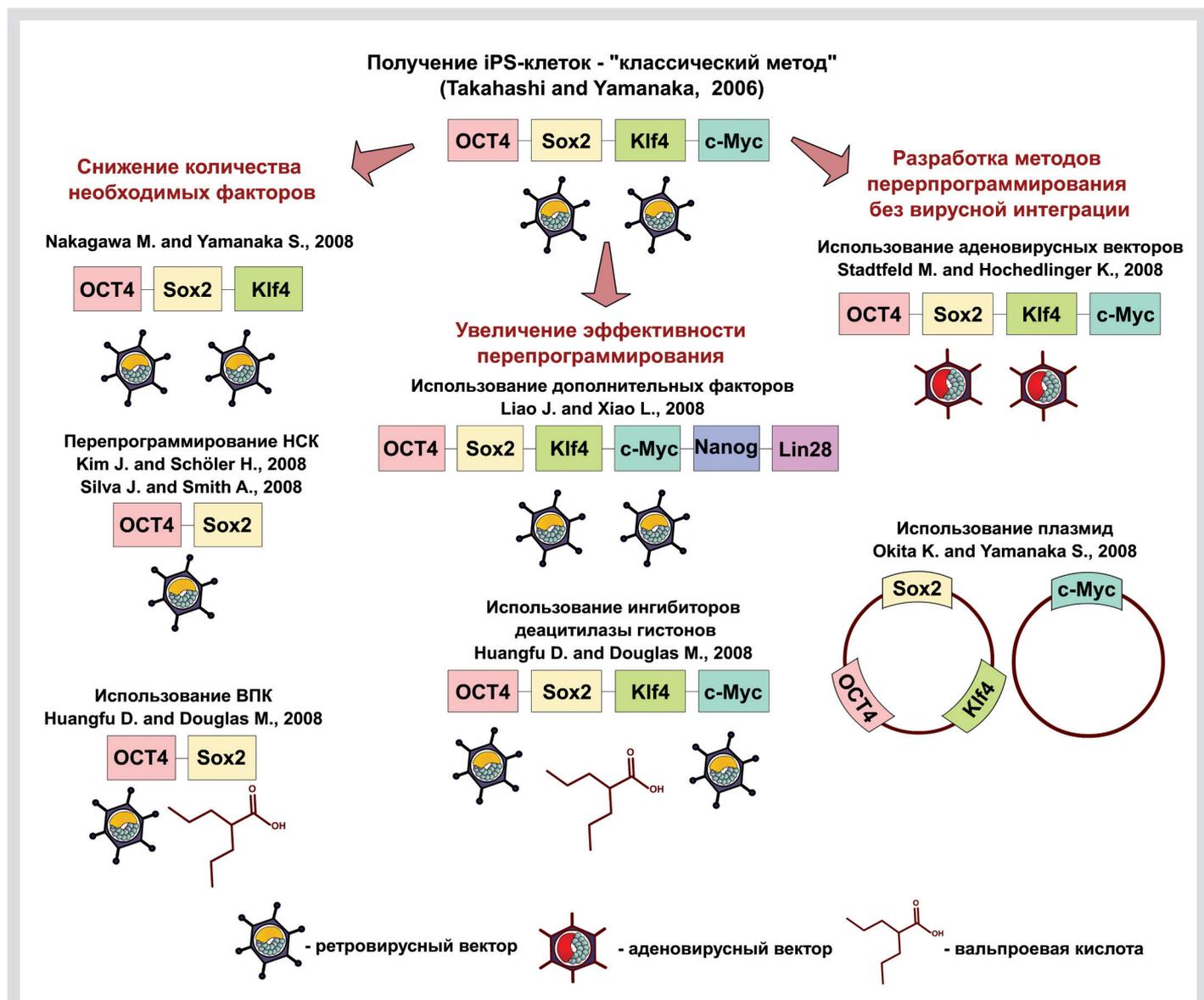
За прошедшие два года были предложены модификации данной методики репрограммирования (см. рис.). Во-первых, чтобы снизить риск онкотрансформации iPS-клеток, протоонкогены c-Myc и Klf4 могут быть заменены на гены Nanog и Lin28 [6] либо можно ограничиться трансфекцией трех (Oct4, Sox2 и Klf4) или

даже двух (Oct4, Sox2) генов плюрипотентности [7, 8]. Во-вторых, эффективность процедуры перепрограммирования, исходно составлявшая около 0,01 % (10–20 колоний iPS-клеток на 100 тыс фибробластов), может быть повышена на порядок за счет совместной трансдукции обоих предложенных «квartetов» генов, т. е. уже шести генов – Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog и Lin28 [9]. Аналогичное по уровню увеличение выхода колоний iPS-клеток наблюдается при дополнительной трансфекции генов теломеразы TERT и большого Т-антигена вируса SV4 [10].

Тем не менее, проблема использования вирусных векторов, интегрирующихся в клеточный геном, служит основной причиной опасений, связанных со степенью надежности и безопасности применения перепрограммированных iPS-клеток в терапии [11]. Интеграция вектора – неконтролируемый процесс, который ассоциирован с риском развития новообразований вследствие спонтанной реактивации вирусных трансгенов, а также вследствие встраивания вектора вблизи потенциальных протоонкогенов. Кроме того, полагают, что инсерционный

мутагенез может служить необходимым стимулом, запускающим клеточное перепрограммирование *in vitro*. Например, вектор может интегрироваться около генов, контролируемых плюрипотентный статус, тем самым обеспечивая их активацию. Хотя анализ ограниченного числа инсерционных сайтов в iPS-клетках подтвердил случайный характер встраивания вектора [12], возможность индукции перепрограммирования в результате векторной интеграции всё же не может быть полностью исключена.

Исследования М. Stadtfeld с соавт. (группа К. Hochedlinger) и К. Okita с соавт. (группа С. Yamanaka), опубликованные в Science Express соответственно 25 сентября и 9 октября, продемонстрировали возможность использования не способных к интеграции векторов (аденовирусных – К. Hochedlinger, аденовирусных и плазмидных – С. Yamanaka) для получения мышинных iPS-клеток. В итоге было показано, что инсерционный мутагенез не оказывает какого-либо значимого влияния на эффективность перепрограммирования клеток.



Основные пути совершенствования методов получения iPS-клеток: ВПК – вальпроевая кислота;
НСК – нейральные стволовые клетки

Обе группы исследователей использовали предложенный S. Yamanaka набор из четырех трансгенов — Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc [2]. В качестве перепрограммируемых клеток были выбраны фетальные и постнатальные клетки печени, а также мышинные фибробласты из тканей хвоста. Изначальное препятствие на пути индукции клеточного перепрограммирования с помощью неинтегрирующихся аденовирусных векторов заключалось в невозможности получить iPS-клетки путем введения четырех указанных факторов. Поэтому в качестве альтернативного пути было предложено использовать модифицированные фетальные гепатоциты, содержащие доксициклин-индуцибельный аллель Oct4 (Oct4IND; группа K. Hochedlinger), либо проводить комбинированную трансфекцию клеток, применяя как ретро-, так и аденовирусные векторы в качестве носителей перепрограммирующих генов (группа S. Yamanaka). Исследователи полагают, что временной экспрессии генов-индукторов плюрипотентности явно недостаточно для изменения статуса дифференцированной клетки и ее возвращения к плюрипотентному состоянию. Важным моментом в поиске эффективной технологии перепрограммирования соматических клеток без векторной интеграции служил выбор адекватного типа клеток. Так, для трансфекции гепатоцитов требуется меньшее количество молекул вектора (20–50 на клетку) по сравнению с фибробластами (50–250 на клетку).

K. Hochedlinger с соавт. в результате трансфекции генов Sox2, Klf4 и c-Myc в составе аденовирусного вектора получили 9 колоний iPS-клеток из Oct4IND фетальных клеток печени. Для этого потребовалось длительное (24–30 сут.) культивирование гепатоцитов в присутствии доксициклина, стимулировавшего устойчивую экспрессию Oct4. При этом из 500 тыс. клеток 20–30% несли все три аденовирусных трансгена. В результате полученные колонии ЭСК-подобных клеток экспрессировали маркеры плюрипотентности (Sox2, SSEA-1) и могли пролиферировать в культуре в отсутствие доксициклина. Далее, авторы этой работы провели трансфекцию фибробластов — клеток, более устойчивых к генетической модификации. С целью визуализации Oct4-экспрессирующих клеток исследователи использовали флуоресцентный Oct4-GFP репортер. В результате была получена одна колония iPS-клеток.

Группа под руководством S. Yamanaka не использовала индуцибельный ген Oct4, а трансфецировала известные гены в составе как аденовирусных, так и ретровирусных векторов. Для обнаружения перепрограммированных клеток репортерным геном служил Nanog, под контролем которого находилась экспрессия GFP и гена резистентности к пиримидину. Интересно отметить, что колонии iPS-клеток формировались лишь в тех случаях, когда Oct4 трансфецировался в составе ретровирусного вектора, что говорит о необходимости стабильной экспрессии Oct4 для индукции перепрограммирования.

Начальные эксперименты послужили основой для перепрограммирования соматических клеток без участия стабильно экспрессирующихся генетических конструкций. M. Stadtfeld с соавт. смогли получить три колонии iPS-клеток из постнатальных гепатоцитов путем трансфекции всех четырех факторов (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) в аденовирусных векторах, при этом в гепатоцитах отсутствовал Oct4IND аллель. Аналогично, колонии iPS-клеток были получены S. Yamanaka и коллегами из мышинных эмбриональных фибробластов с использованием плазмидных векторов (гены Oct4, Klf4 и Sox2 располагались в одной плазмиде, c-Myc — в другой).

Таким образом, обе исследовательские группы наглядно продемонстрировали возможность формирования плюрипотентных iPS-клеток без интеграции трансгенов в геном соматической клетки.

Плюрипотентность полученных iPS-клеток была подтверждена хорошо известными молекулярными и функциональными тестами. Действительно, iPS-клетки экспрессировали характерный для ЭСК профиль генов плюрипотентности (Nanog, ECAT1, Rex1, Fbx15 и др.), формировали тератомы при введении иммунодефицитным SCID мышам и давали начало здоровым химерным животным после трансплантации отдельных iPS-клеток в бластоцисту. Более того, K. Okita с соавт. получили жизнеспособное потомство от скрещивания химерных самцов с самками дикого типа, при этом все клетки полученных зародышей экспрессировали флуоресцентный репортерный белок GFP. Важно отметить, что ни у одной из химерных мышей не было отмечено опухолевых процессов в течение 4–13 мес. после рождения, что свидетельствует о безопасности применения предложенного набора трансгенов.

Особое внимание в обеих публикациях отведено анализу возможной (хотя и не характерной для аденовирусных и плазмидных векторов) интеграции векторной ДНК в геном клеток. С использованием ПЦР и Саузерн-блоттинга было показано, что интеграция генетического материала вектора фактически не является необходимым условием для формирования iPS-клеток, хотя и может наблюдаться в единичных случаях. Это согласуется с предыдущей работой группы S. Yamanaka, в которой не было обнаружено каких-либо определенных сайтов интеграции ретровирусных векторов в геном модифицированных соматических клеток [12].

В дополнение, группа S. Yamanaka изучила происхождение полученных iPS-клеток, чтобы исключить возможность контаминации образцов ЭСК, несущими репортерный Nanog-GFP трансген. Метод SSLP показал, что iPS-клетки формируются именно из линий мышинных эмбриональных фибробластов. Важность данного эксперимента обусловлена предположением, что iPS-клетки формируются из клеток, изначально являющихся мульт- или плюрипотентными. Согласно критическим замечаниям S.V. Liu, популяция iPS-клеток может происходить из стволовых клеток, присутствующих среди дифференцированных клеток печени либо фибробластов [13,14]. Другими словами, речь может идти не о перепрограммировании соматических клеток в плюрипотентные, а лишь о селективной пролиферации стволовых клеток, уже присутствующих в образце. Полностью исключить такую возможность сложно, однако весомым свидетельством в пользу обратного служит отсутствие примитивных постнатальных клеток, экспрессирующих маркеры плюрипотентности и функционально соответствующих ЭСК. В частности, Oct4 не играет какой-либо существенной роли в поддержании функционального состояния стволовых клеток взрослого организма, а его экспрессия в соматических клетках — по-видимому, следствие ПЦР-амплификации присутствующих в геноме псевдогенов [15,16]. С другой стороны, как показали недавние эксперименты, перепрограммировать соматические стволовые клетки в iPS-клетки значительно легче, нежели дифференцированные [17].

Интересно также отметить, что 3 из 13 линий iPS-клеток, полученных K. Hochedlinger и коллегами, содержали тетраплоидные клетки. При этом полиплоидия не наблюдалась в предыдущих экспериментах, где использовались ретро- или лентивирусные векторы.

Наиболее очевидным объяснением этого может служить тот факт, что до 90% гепатоцитов взрослого организма изначально полиплоидны (тетра- или октаплоидны) [18]. Это означает, что несмотря на эффективность инфицирования гепатоцитов аденовирусными векторами (требуется 1–4 вектора на клетку), существует реальная опасность дисфункции клеточного генома iPS-клеток вследствие его полиплоидности.

В целом, обе работы показали, что iPS-клетки могут быть получены без использования интегрирующихся векторов, хотя и в значительно меньшем количестве. Так, по данным S. Yamanaka, использовать ретровирусы, можно полностью перепрограммировать более 100 из 1×10^6 клеток, трансфецированных генами трех факторов плюрипотентности, или более 1000 в случае использования четырех факторов. В то же

время, новая технология позволила получить от 1 до 29 колоний iPS-клеток, т. е. выход перепрограммированных клеток составил 0,0001–0,001%, что почти на два порядка ниже, чем при использовании интегрирующихся векторов.

Исследования K. Hochedlinger и S. Yamanaka, несомненно, стали существенным шагом к направленному получению плюрипотентных стволовых клеток без использования методов, существенным недостатком которых является потенциальная дестабилизация клеточного генома. Таким образом, перепрограммирование соматических клеток без векторной интеграции может стать ведущим направлением в получении iPS-клеток — одной из главных, и, несомненно, самой популярной на сегодняшний день альтернативы эмбриональным стволовым клеткам человека.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 39–49.
2. Takahashi K., Yamanaka S.. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663–76.
3. Бозо И.Я. Новое направление получения ЭСК. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2007; II(4): 9–11.
4. Бозо И.Я. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2008; III(1): 22–3.
5. Kennedy D. Breakthrough of the year. *Science* 2007; 318(5858): 1833. [Full Text]
6. Yu J., Vodyanik M., Smuga-Otto K. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917–20.
7. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26(1): 101–6.
8. Huangfu D., Osafune K., Maehr R. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26: 1269–75.
9. Liao J., Wu Z., Wang Y. et al. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a

- combination of six transcription factors. *Cell Res.* 2008; 18(5): 600–3.
10. Park I., Zhao R., West J. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141–6.
11. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313–7.
12. Aoi T., Yae K., Nakagawa M.. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 321(5889): 699–702.
13. Liu S. iPS cells: a more critical review. *Stem Cells Dev.* 2008; 17(3): 391–7.
14. Liu S. Towards a balanced view on iPS cells. *Logical Biology* 2008; 8(1): 32–8.
15. Lengner C., Camargo F., Hochedlinger K. et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1(4): 403–15.
16. Григорян А.С. Экспрессия фактора Oct4 не требуется для самообновления соматических стволовых клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2008; III(1): 21–2.
17. Kim J., Zaehres H., Wu G. et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454(7204): 646–50.
18. Guidotti J., Brigrerie O., Robert A. et al. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(21): 19095–101.

Подготовил А.А. Леявский

По материалам: Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. *Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. Science* 2008; 322(5903): 949–53. Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. *Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. Science* 2008; 322(5903): 949–53

МикроРНК модулируют активность факторов плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток — Nanog, Oct4 и Sox2

МикроРНК — это короткие последовательности из 20–25 рибонуклеотидов, основной функцией которых является подавление трансляции определенных матричных РНК (мРНК), что приводит к остановке синтеза белка (1–2). В течение многих лет они привлекают интерес научного мира, являясь одним из основных регуляторов экспрессии генов. Считается, что микроРНК связываются с нетранслируемыми областями мРНК, расположенных на 3'-конце, что справедливо для большинства микроРНК (3, 4). Исключений из этого правила очень немного

(5, 6). Вместе с тем вопрос о мишенях микроРНК остается крайне важным, так как детальное знание о механизмах их действия в каждом конкретном случае совершенно необходимо для понимания регуляции экспрессии генов, что неразрывно связано со всеми процессами, происходящими в клетке — как нормальными, так и патологическими.

Научная группа Y. Тау длительное время занимается изучением функциональных особенностей микроРНК. Именно в их лаборатории была предсказана возможность

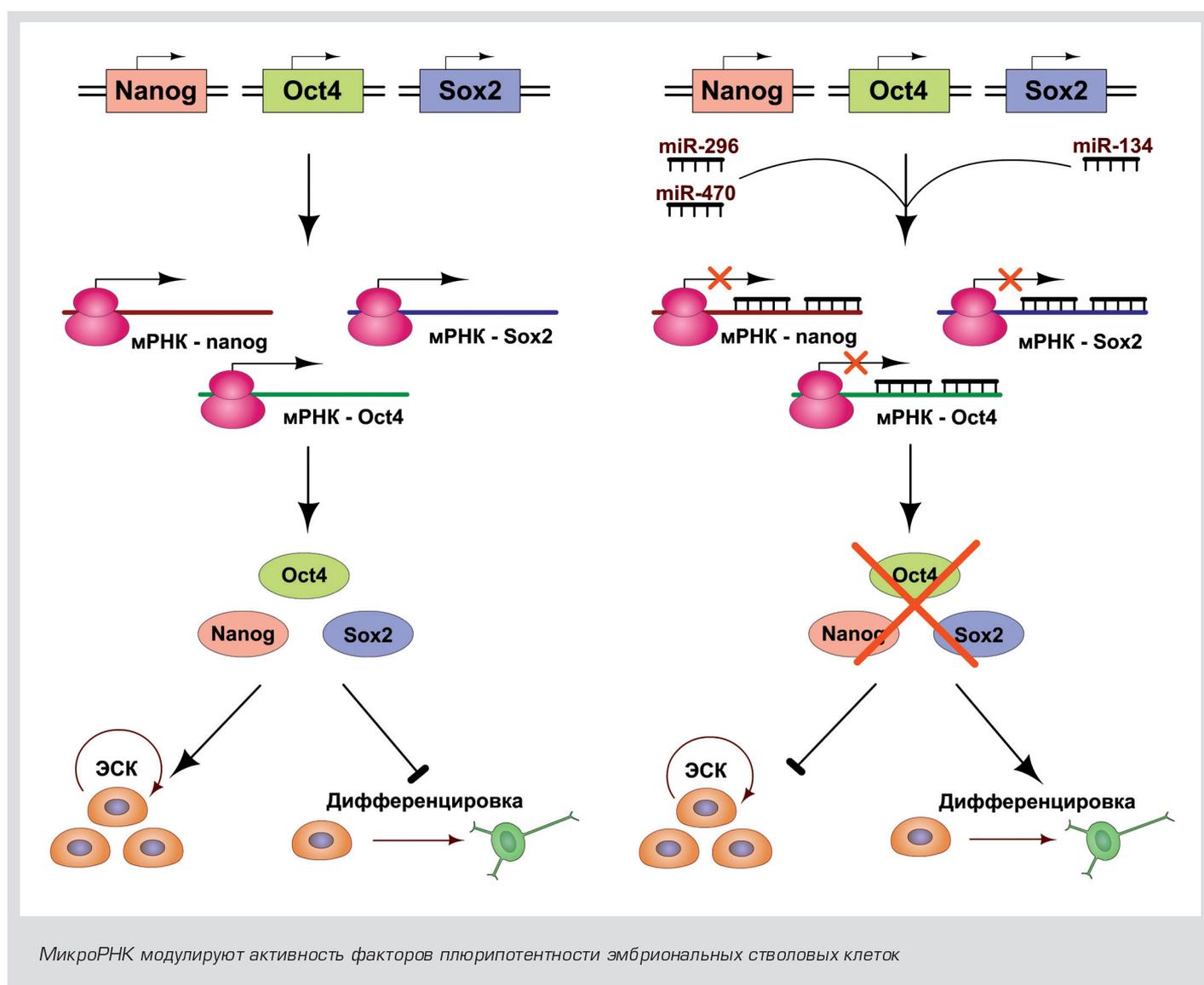
существования многочисленных специфических сайтов связывания микроРНК в пределах мРНК (7). В качестве модельных генов были выбраны *nanog*, *oct4* и *sox2*, которые кодируют три основных фактора плюрипотентности мышиных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), а также определяют начало их дифференцировки (8–11). В своей последней работе авторы индуцировали дифференцировку ЭСК линии E14 с помощью ретиновой кислоты и обнаружили, что при этом, спустя некоторое время, происходит существенное повышение количества в клетке лишь трех микроРНК из всех известных: *miR-296*, *miR-470* и *miR-134*. Каждая из них, как было показано, связывается сразу с несколькими сайтами на мРНК белков *Nanog*, *Oct4* и *Sox2*, а именно:

- *miR-296* имеет два комплементарных участка на мРНК *Nanog*;
- *miR-470* связывается с шестью сайтами на мРНК *Nanog* и с тремя сайтами на мРНК *Oct4*;
- *miR-134* имеет пять последовательностей-мишеней на мРНК *Sox2*.

Такое количество сайтов связывания предполагает, что эти три микроРНК могут регулировать процессы поддержания плюрипотентности и дифференцировки ЭСК в разных вариантах в зависимости от уровня их экспрес-

сии и соотношений. Трансфекция ЭСК пре-*miR-296*, пре-*miR-470* и пре-*miR-134* по отдельности, то есть искусственное увеличение в клетках концентрации одной из микроРНК, приводила к резкому снижению синтеза соответствующего белкового продукта. Интересно, что в контрольных экспериментах исследователи провели двойную трансфекцию дифференцированных клеток линии 293Т генами *nanog*, *sox2* и *oct4* и соответствующими пре-микроРНК, показав, что в таком случае полностью дублируются события, происходящие в ЭСК. Трансфекция как ЭСК, так и клеток линии 293Т другими пре-микроРНК не влияла на экспрессию генов трех выбранных транскрипционных факторов. Внесение же мутаций в сайты связывания *miR-296*, *miR-470* и *miR-134* на мРНК *Nanog*, *Oct4* и *Sox2* приводило к невозможности подавления трансляции, и в клетке обнаруживались белковые продукты интересующих генов.

Основной вопрос, однако, оставался в индукции с помощью микроРНК дифференцировки ЭСК и изменения их морфологии. Раньше Y. Тау и соавт. было показано, что *miR-134*, подавляя экспрессию гена *nanog*, запускает дифференцировку ЭСК (12). Относительно же двух других микроРНК до настоящего времени ничего известно не было.



Трансфекция ЭСК линии E14 пре-miR-296 привела к повышению экспрессии следующих маркеров дифференцировки: Fgf5, Sox1, Mixl1 и Kdr. В присутствии ретиноевой кислоты такая трансфекция также приводила к ускорению запуска экспрессии эктодермальных маркеров Sox1, Fgf5 и Otx2, резкому снижению экспрессии Nanog, а также некоторому снижению количества мРНК белков Oct4 и Sox2. В течение трех суток после трансфекции клетки приобретали характерные для дифференцирующихся в эктодермальном направлении ЭСК черты, распластывались по субстрату, лишались способности к синтезу щелочной фосфатазы и способности формировать колонии. При этом, что весьма логично предположить, двойная трансфекция клеток пре-miR-296 и мутантным геном nanog, чья мРНК не имеет сайтов связывания микроРНК, позволяла ЭСК сохранить плюрипотентность и способность к самообновлению, равно как и их морфологические характеристики.

Точно также трансфекция пре-miR-470 приводила к изменению фенотипа ЭСК через трое суток, снижению экспрессии щелочной фосфатазы и повышению экспрессии несколько иного спектра эктодермальных дифференцировочных маркеров, а именно Fgf5, Nes и Otx4.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281–97.
2. Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001; 15: 188–200.
3. Hammond S.M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5822–9.
4. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genet.* 2000; 24: 372–6.
5. Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 5307–17.
6. Pan G., Thomson J.A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 2007; 17: 42–9.
7. Miranda K.C., Huynh T., Tay Y. et al. A pattern-based method for

the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; 126: 1203–17.

При блокировании в ЭСК функционирования микроРНК, клетки практически переставали реагировать на индукцию дифференцировки с помощью ретиноевой кислоты. Эту работу можно по праву назвать выдающейся: авторы провели несколько серий весьма убедительных экспериментов с большим количеством контрольных опытов, показав, что микроРНК играют ключевую роль в дифференцировке ЭСК и, таким образом, являются факторами, регулирующими процесс эмбрионального развития на самых ранних его этапах. Связываясь с большим числом сайтов на мРНК помимо консервативных последовательностей в ее 3'-области, они могут осуществлять сложные взаимодействия со своими мишенями, реализуя, по-видимому, видоспецифическую программу развития ЭСК.

В последний год по данным US Public Library of Medicine (13) по изучению микроРНК было проведено более тысячи работ в самых разных областях — от биологии старения и фундаментальных вопросов эмбриогенеза, до онкологии и других клинических направлений. Видимо, в последующие несколько лет интерес к этим небольшим молекулам не ослабнет, так как их роль в решении фундаментальных и прикладных проблем биологии и медицины очевидна.

8. Slack F.J., Basson M., Liu Z. et al. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell* 2000; 5: 659–69.

9. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; 75: 843–54.

10. Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5904–10.

11. Rajewsky N. MicroRNA target predictions in animals. *Nature Genet.* 2006; 38: S8–13.

12. Tay Y.M., Tam W.L., Ang Y.S. et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. *Stem Cells* 2008; 26: 17–29.

13. <http://www.pubmed.com>

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., Lim B., Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 2008; 455 (7216): 1124–8

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Новые данные об эффективности трансплантации клеток печени пациентам с синдромом Криглера – Найяра

Синдром Криглера – Найяра (СКН) 1 типа является аутосомно-рецессивным заболеванием, связанным с мутацией гена UGT1A1, которая приводит к полному отсутствию активности фермента печени уридиндифосфатглюкоронилтрансферазы (УДФГТ) и, как следствие, к накоплению неконъюгированного билирубина в крови (выше 200 мкмоль/л). Билирубин аккумулируется в ядрах серого вещества головного мозга, что является причиной судорог, опистотонуса, нистагма, атетоза и иной неврологической симптоматики. Манифестация

заболевания наступает в первые часы жизни. Больные чаще погибают в течение первого года. Изменений печени (биохимических, гистологических) как правило обнаружить не удается. Проба с фенобарбиталом не дает результата (фенобарбитал индуцирует активность УДФГТ, но в связи с отсутствием этого фермента при данном синдроме препарат не имеет точки приложения).

При синдроме Криглера – Найяра 2 типа манифестация наступает несколько позже — в первые месяцы жизни. Проявления сходны с синдромом 1 типа, но менее

тяжелые, т.к. УДФГТ присутствует в гепатоцитах, хотя активность ее значительно снижена. Уровень неконъюгированного билирубина в крови не достигает 200 мкмоль/л. Достаточно эффективны фенобарбитал и фототерапия.

В настоящее время используются несколько способов лечения синдрома Криглера – Найяра 1 типа. Наиболее эффективным является ортотопическая трансплантация печени. Ограничение количества донорских органов, их высокая стоимость делают его недоступным для большей части больных. Кроме того, 15% пациентов перенёвших операцию нуждаются в повторной пересадке органа, в связи с отторжением трансплантата или развитием инфекционных заболеваний, вынуждающих остановить иммуносупрессию [1].

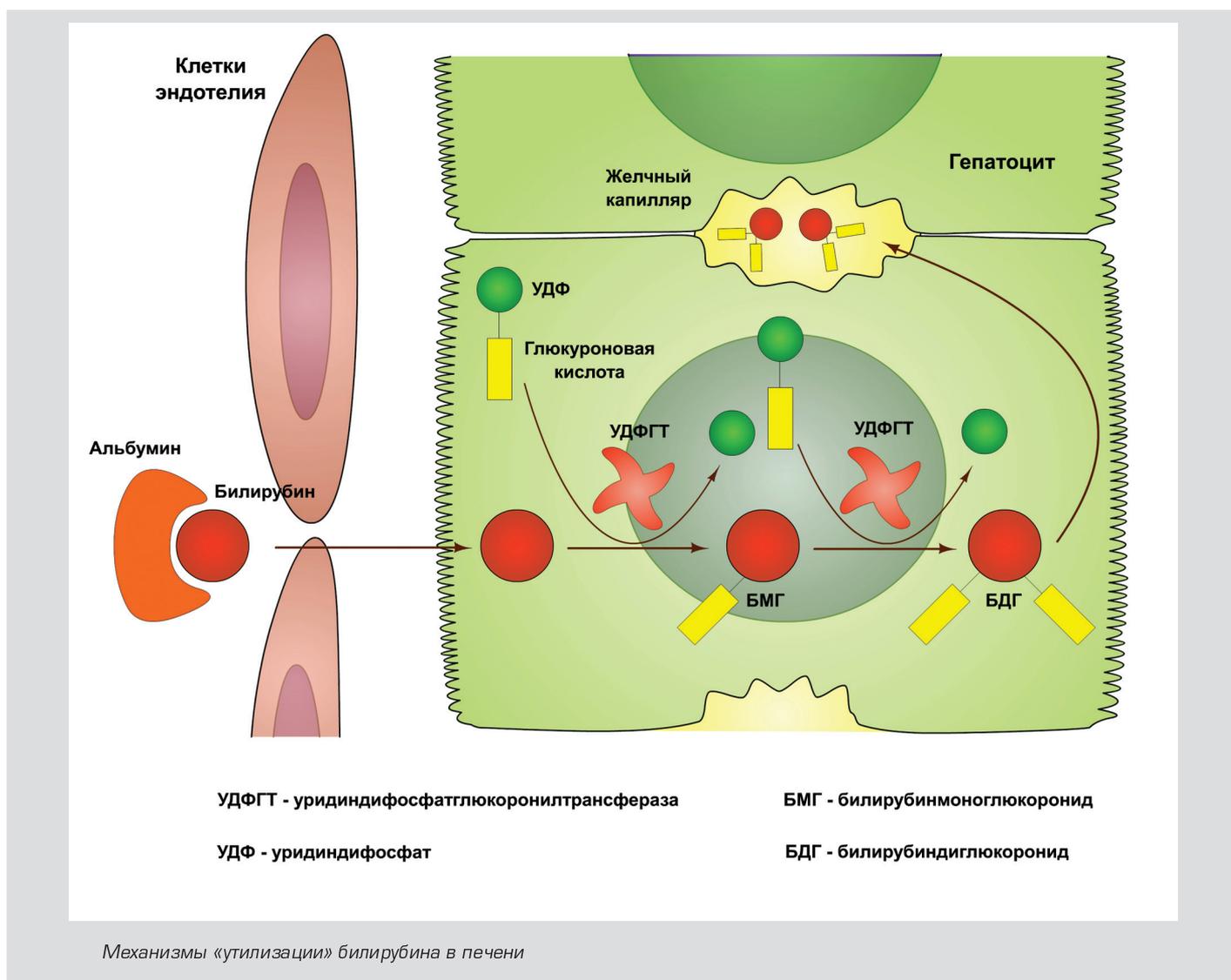
Некоторые успехи были достигнуты при использовании генной терапии в экспериментах на животных. Им инъецировали лентивирус, который способен экспрессировать в клетках печени под действием специфического промотора фермент УДФГТ. Однако в настоящее время данный метод ограничивается выработкой у реципиента фермент-специфичных антител, в связи с чем продолжительность эффекта не превышает года [2–4].

Терапия клетками печени появилась как альтернативное направление в лечении синдрома Криглера – Найяра 1 типа, и занявшая промежуточное место между генной терапией и ортотопической пересадкой органа. Преимущ-

ества данного метода состоят в том, что клетки могут быть доставлены в печень без лишнего операционного вмешательства, и обеспечить достаточную выработку фермента для поддержания непрямого билирубина в сыворотке крови в норме. Помимо этого, проблема донорства не стоит здесь так остро как при трансплантации целого органа. Новые данные об эффективности данного метода были опубликованы минувшим летом бельгийскими врачами под руководством E.M. Sokal.

К настоящему времени уже накоплен некоторый опыт в данной области. Он включает в себя как многочисленные эксперименты на животных, так и клинические исследования. В качестве объекта для эксперимента используются ген-модифицированные животные с мутацией гена UGT1A1. Наилучшие результаты были достигнуты, когда трансплантации клеток предшествовало запланированное повреждение печени, что создавало регенеративный стимул для клеток [5, 6]. При этом наблюдалось снижение билирубина сыворотки крови на 13–38% в течение месяца.

Первая демонстрация клинической эффективности метода относится к 1998 г., когда в Английском Королевском госпитале $7,5 \times 10^8$ жизнеспособных клеток печени были инъецированы пациенту с СКН 1 типа в возрасте 10 лет [1]. После этого в течение 11 мес. наблюдалось снижение уровня неконъюгированного билирубина в



плазме крови на 27%. В желчи был также идентифицирован прямой билирубин, что свидетельствует о наличии ферментативной активности УДФГТ.

В 2008 г. были проведены новое клиническое исследование, в котором лечение получили два пациента — девочки в возрасте года и 9 лет. Первая пациентка получила 14 трансфузий гепатоцитов, взятых от одного донора. Установлено, что уровень непрямого билирубина у нее снизился с 375 ммоль/л до 207 ммоль/л, но через 4 мес. он стал стремительно расти. Девочке была произведена ортотопическая пересадка печени.

Пациентке 9 лет было проведено 18 трансфузий, полученных от 3 различных доноров. После трансплантации клеток печени уровень непрямого билирубина опустился с 370 ммоль/л до 220 ммоль/л. Однако, спустя 6 мес. его концентрация снова возросла до предоперационного значения, в связи с чем была произведена ортотопическая пересадка печени.

Показано отсутствие ранних послеоперационных осложнений, что свидетельствует в пользу безопасности данного метода. Вместе с тем, отмечается короткая продолжительность лечебного эффекта, что может быть связано с неблагоприятными аутоиммунными реакциями, недостаточной функциональной активностью трансплантируемых клеток и их низкой репопуляционной способностью. Одним из важнейших направлений в данной области является разработка средств иммуннокоррекции

реакций «хозяин-трансплантат». Как было выяснено такие иммуносупрессоры как Такролимус, Рапамицин и многие другие оказывают негативное воздействие на пролиферативные возможности трансплантируемых клеток печени, что ограничивает их использование [7]. Наиболее перспективным решением данной проблемы остаётся использование инкапсулированных клеток [8]. Однако, здесь учёные сталкиваются с проблемой создания адекватного интракапсулярного микроокружения, позволившего бы надолго сохранить функциональную активность клеток [9].

Следовательно, на данном этапе своего развития введение гепатоцитов как способ лечения синдрома Криглера-Найяра является эффективным методом для поддержания жизнеспособности пациентов ожидающих ортотопическую пересадку печени. После трансплантации гепатоцитов, у пациентов значительно улучшаются показатели функциональной активности органа, снижается необходимость в других процедурах (фототерапия, кровопускания, обменные переливания крови, альбумина, плазмаферез), что улучшает их качество жизни. Возможно в будущем трансплантация клеток печени будет являться одним из наиболее эффективных способов лечения не только синдрома Криглера — Найяра, но и иных метаболических нарушений печени, таких как гиперхолестеролемиа, нарушения синтеза факторов свёртывания крови и др.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Fox I.S., Chowdhury J.R., Kaufman S.S. et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *Engl. J. Med.* 1998; 338: 1422–6.
2. Kautman S.S., Wood R.P., Show P.W. jr., Markin R.S. Orthotopic liver transplantation for type I Crigler-Najjar syndrome. *Hepatology* 1986; 6: 1259–62.
3. Sokal E.M., Silva E.S., Hermans D. Orthotopic liver transplantation for Crigler-Najjar type I disease in six children. *Transplant.* 1995; 60: 1035–58.
4. Evans H.M., Kelly D.A., Mc Kierman P.S., Hubscher S. Progressive histological damage in liver allografts following pediatric liver transplantation. *Hepatology* 2006; 43: 1109–17.

5. Makouka L., Falk J.A., Falk R.E. Allogenic intrasplenic hepatocyte transplantation. *Transplant. Proc.* 1987; 19: 1002–3.

6. Cubero E.S., Maganto P., Ortiz A. Hepatic proliferation in Gunn rats transplanted with hepatocytes. *Cell Prolis.* 2005; 38: 134–46.

7. Wu Y.M., Joseph B., Gupta S. Immunosuppression using mTOR inhibition mechanism affects replacement of rat liver with transplanted cells. *Hepatology* 2006; 44: 410–9.

8. Dixit V., Darnasi R., Arthur M. et al. Cryopreserved microencapsulated hepatocytes-transplantation studies in Gunn rats. *Transplant.* 1993; 55: 616–22.

9. Liu Z.C., Chang T.M. Coencapsulation of hepatocytes and bone marrow stem cells. *Int. J. Artif. Organs* 2003; 26: 491–7.

Подготовил И.Л. Плакса

По материалам: Lysy P.A., Najimi M., Bourgois A. et al. Liver cell transplantation for type I Crigler-Najjar syndrome. Update and perspectives. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14(22): 3464–70

Трансплантированные фетальные клетки вовлечены в патологический процесс при болезни Паркинсона

Болезнь Паркинсона — хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание центральной нервной системы, проявляющееся, главным образом, нарушением произвольных движений в виде гипокинии, мышечной ригидности, тремора кистей рук, нижней челюсти, языка, головы и постуральных расстройств [1]. Кроме того, клиническая картина заболевания включает речевые расстройства (мягкость, хриплость, монотонность речи), нарушения глотания и связанные с ними слюнотечение. Больных отличает маскообразное лицо (гипомимия), бесконтрольные непроизвольные движения даже в сидячем положении (акатизия), депрессивное состояние и расстройство когнитивных функций [1, 2].

До настоящего времени этиология болезни Паркинсона в полной мере не ясна. Определённую роль играют повреждения головного мозга — травмы, инсульты. К настоящему времени наибольшее значение отводится генетическим дефектам, наличие которых обуславливает повышение восприимчивости нейронов к токсическому действию ряда веществ (пестицидов, соединений марганца и железа), индуцирующих генерацию активных форм кислорода [3] или связывающих нейромеланин [4].

В любом случае, ключевым звеном патогенеза заболевания является снижение уровня дофамина в экстрапирамидной системе и гибель дофаминэргических нейронов черной субстанции среднего мозга, связанных со

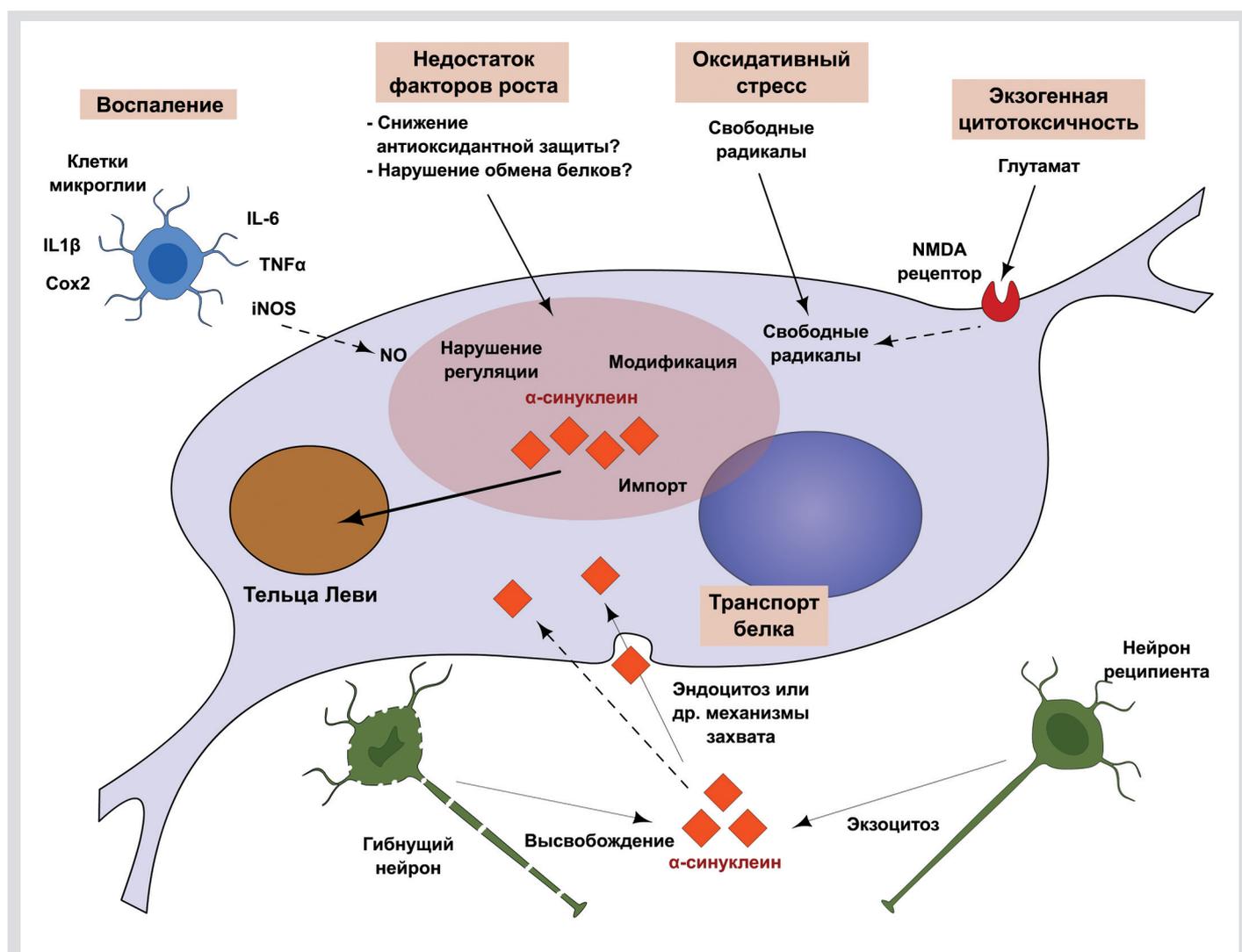
стриопаллидарной системой. В результате дисбаланса взаимодействия полосатого тела и бледного шара нарушаются двигательные функции [1–3]. Более того, характерна диссеминация дегенеративных процессов в нервной системе, затрагивающих также и дофаминэргические нейроны [5].

Тактика лечения пациентов с болезнью Паркинсона базируется на применении препаратов, устраняющих дефицит медиатора в нервной системе или активирующих дофаминовые рецепторы. Положительный терапевтический эффект наблюдается при использовании М-холинолитиков, инактивирующих холинэргические нейроны, участвующие в регуляции двигательной функции. Однако консервативная терапия, облегчающая состояние пациентов в течение длительного времени, с годами становится менее эффективной — развивается привыкание, накапливается комплекс побочных эффектов. Такая ситуация побуждает научный мир к развитию нового — биотехнологического подхода в лечении, основанного, главным образом, на восстановлении пула дофаминэргических клеток черной субстанции.

В соответствии с этим направлением опубликован целый ряд работ, описывающих положительные результаты трансплантации культур клеток нервной ткани, по-

лученных из эмбрионов человека возрастом 6,5–9 нед., в область стриопаллидарной системы и черной субстанции среднего мозга [6–8]. Несмотря на значительные успехи, авторы большинства исследований не рассматривают отдаленные результаты клеточной терапии, что во многом связано с выполнением работ на экспериментальных моделях. В этой связи значительный интерес привлекли материалы клинических исследований двух независимых научных групп (J.H. Kordower и др., J.-Y. Li и др.), опубликованных в Nature Medicine, и посвященных анализу состояния трансплантированных клеток у пациентов с болезнью Паркинсона в отдаленном периоде.

Для гистологического обоснования повреждения введенных нейронов авторы в процессе посмертного исследования определяли наличие в нейронах образцов трансплантированных нервных тканей телец Леви — цитоплазматических включений, нарушающих внутриклеточный транспорт между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи, что приводит к гибели нейронов при болезни Паркинсона [9]. Периферическая часть телец Леви представлена радиально расходящимися фибриллами α -синуклеина, связанными с убиквитинном [10]. Иммуногистохимические реакции с антителами



Вероятные механизмы, лежащие в основе распространения патологических изменений на трансплантированные нейроны при болезни Паркинсона. По P. Brundin et al. [2008] с изменениями

против этих белков авторы использовали для идентификации патологических включений.

В сумме двух исследований оценивались отдалённые результаты (до 16 лет после трансплантации) внутримозгового введения трем пациентам нейронов, полученных из вентральной части эмбрионального среднего мозга. Во всех случаях проводимые прижизненные диагностические мероприятия в первые 8–10 лет (оценка двигательной функции, позитронно-эмиссионная томография) указывали на улучшение физиологического состояния пациентов, особенно по сравнению с контролем — группой больных, которым не выполнялись трансплантационные мероприятия. Морфофункциональной основой клинического улучшения являлась интеграция трансплантированных клеток с нейронами реципиента и активная продукция ими дофамина. Однако впоследствии наблюдалось плавное нарастание клинической симптоматики — вновь усиливались признаки болезни Паркинсона. На выяснение причин этого процесса и были нацелены исследования обеих лабораторий.

Авторы отметили значительную инфильтрацию клетками микроглии зоны, окружающей область введения нейронов, что может свидетельствовать о воспалительном ответе, вызванном трансплантационными мероприятиями и/или собственно наличием аллогенных фетальных клеток. В результате посмертного иммуногистохимического анализа ткани среднего мозга всеми исследователями было установлена положительная реакция введённых нейронов на антитела против тирозингидроксилазы (tyrosine hydroxylase, TH), участвующей в биосинтезе дофамина, а также против везикулярного транспортера моноаминов (vesicular monoamine transporter 2, (VMAT2)), что указывает на вовлечение трансплантированных клеток в секрецию дофамина. Кроме того, они

содержали нейромеланин — маркер нейронов черной субстанции. J.H. Kordower с соавт. также установили, что к 14 годам после трансплантации уровень экспрессии транспортера дофамина (dopamine transporter (DAT)) во введенных клетках снижается. При этом повышается содержание α -синуклеина и убиквитина. Так, к 12 годам после трансплантации в 40% TH-положительных нейронов среднего мозга обнаруживаются тельца Леви, а к 16 годам — в 80% дофаминэргических клеток [11]. Эта закономерность находится в соответствии с предположением, что старение — предрасполагающий фактор болезни Паркинсона.

В материалах исследований не поднимался вопрос о гетерогенности фетального клеточного материала, использованного для трансплантации [13]. I. Mendez с соавт. показали в своей работе, что около половины выжившей после введения в средний мозг клеточной популяции представлена серотонинэргическими нейронами, которые не оказывают никакого терапевтического влияния. Следовательно, «эффективная» часть вводимого материала оказывается в два раза меньшей, чем планировалась. Такое несовершенство методики получения дофаминэргических клеток, по всей видимости, ограничивает время положительного клинического эффекта трансплантации в свете продолжающегося повреждения введённых дофаминэргических нейронов.

Таким образом, в исследованиях двух независимых научных групп было показано, что введённые в средний мозг больных болезнью Паркинсона аллогенные нейроны вовлекаются в патологический процесс, о чем свидетельствует накопление в них телец Леви в отдаленном периоде. Поэтому, пока причины прогрессии болезни Паркинсона не будут достоверно установлены, успешность клеточной терапии будет носить временный характер (первые годы после трансплантации).

ЛИТЕРАТУРА:

1. JanKovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2008; 79(4): 368–76.
2. Lepoutre A., Devos D., Blanchard-Dauphin A. A specific clinical pattern of camptocormia in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2006; 77(11): 1229–34.
3. Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1998; 13(1): 24–34.
4. Cotzias G. Manganese, melanins and the extrapyramidal system. *J. Neurosurg.* 1966; 24 (1): 170–80.
5. Lang A.E., Obeso J.A. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol.* 2004; 3(5): 309–16.
6. Wernig M., Zhao J., Pruszk J. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *PNAS* 2008; 105(15): 5856–61.
7. Freed C.R., Greene P.E., Breeze R.E. et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J.*

Med. 2001; 344: 710–19.

8. Björklund A., Dunnett S.B., Brundin P. et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2003; 2(7): 437–45.
9. Olanow C.W., Perl D.P., DeMartino G.N. et al. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol.* 2004; 3(8): 496–503.
10. Duffy P., Tennyson V. Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus coeruleus in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1965; 24: 398–414.
11. Li J.-Y., Englund E., Holton J.L. et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 2008; 14(5): 501–3.
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. Mendez I., Vicuela A., Astradsson A. et al. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat. Med.* 2008; 14(5): 507–9.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Li J.-Y., Englund E., Holton J.L. et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 2008; 14(5): 501–3.
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

Миелоаблативные режимы кондиционирования увеличивают эффективность адоптивного переноса Т-лимфоцитов при метастатической меланоме

Меланома — злокачественная опухоль, возникающая из пигментных клеток кожи, реже — сосудистой оболочки глаза и рассеянных меланоцитов в других органах. Меланомы могут возникать *de novo* в неизменной коже, однако чаще они возникают при малигнизации доброкачественного невуса. Меланома отличается крайне высокой злокачественностью и непредсказуемостью клинического течения. Медиана выживаемости при метастатической меланоме составляет 8 мес., общая двухлетняя выживаемость подобных пациентов составляет 10–15%. В отличие от других злокачественных опухолей, для которых разработаны комплексные и мультимодальные химиотерапевтические схемы, для лечения метастатической меланомы существуют только два общеиспользуемых химиотерапевтических агента — ИЛ-2 и дакарбазин, при этом доля объективных клинических ответов составляет лишь около 15%.

Вместе с тем, меланома традиционно считается одной из наиболее иммуногенных опухолей, и у пациентов с меланомой часто обнаруживают антитела к меланотарным и/или опухолевым антигенам и/или циркулирующие опухолеспецифичные Т-лимфоциты [1-3]. Однако большинство попыток разработать антигенспецифичные вакцины для лечения метастатических меланом потерпели неудачу. Доля объективных клинических ответов на лечение составляет от 0 до 8% (в среднем около 3,5%), при этом наиболее успешными являются стратегии, основанные на дендритноклеточной вакцинации [4]. В связи с этим, в последние годы произошел некоторый сдвиг внимания исследователей в этой области в сторону адоптивного переноса Т-лимфоцитов.

В своей работе, опубликованной в *Nature Medicine* в 2004 г. [4], S. Rosenberg и N. Restifo, помимо исчерпывающего обзора существующих протоколов клеточной вакцинации при меланоме (см. выше), сформулировали критерии, выполнение которых необходимо для иммуноопосредованной деструкции клинически детектируемых, распространенных опухолей: 1) *in vivo* генерирование достаточного количества иммунных клеток, способных к высокоавидному распознаванию опухолевых антигенов; 2) способность генерированных клеток инфильтрировать опухолевую строму и 3) способность генерированных клеток активироваться в опухолевом очаге и реализовывать присущие им эффекторные функции, приводящие к разрушению опухоли, такие как непосредственный лизис опухолевых (эндотелиальных, стромальных и пр.) клеток или секреция определенных цитокинов.

В протоколах, основанных на вакцинации, количество генерированных опухолеспецифичных Т-клеток обычно относительно мало, они характеризуются сравнительно низкой авидностью к опухолевым антигенам, а их антигенный репертуар узок в силу использования для вакцинации ограниченного набора (а обычно одного) пептидов [4]. Толерогенные эффекты опухоли и регуляторных Т-клеток, по-видимому, также в ответе за неэффективность вакцинации в лечении распространенных опухолей. При адоптивном Т-клеточном переносе, опухолеспеци-

фичные Т-клетки, полученные из опухолиинфильтрирующих Т-лимфоцитов, после культивирования в присутствии ИЛ-2 подвергаются селекции на способность активироваться (секретировать ИFN- γ) множеством опухолевых антигенов (совместное культивирование Т-клеточных клонов и аутогенных и/или аллогенных опухолевых клеточных линий), а полученные опухолеспецифичные Т-клеточные клоны подвергаются быстрой клональной экспансии при помощи культивирования в присутствии ИЛ-2 и анти-CD3-антител. Таким образом, пациенту вводят большие количества высокоавидных опухолеспецифичных Т-клеток, распознающих широкий спектр опухолевых антигенов, что создает по крайней мере теоретические предпосылки для эффективности подобных подходов [5].

Первые клинические испытания, в которых использовалось сочетание адоптивного переноса аутогенных опухолейинфильтрирующих лимфоцитов с высокодозным ИЛ-2 приводило к частичной регрессии опухолей приблизительно у трети пациентов, однако длительность ремиссий была обычно короткой [6]. В то же время, проведенные еще в начале 80-х годов доклинические испытания продемонстрировали, что эффективность адоптивного Т-клеточного переноса значительно увеличивается при использовании предварительной иммунодепрессии химиотерапевтическими препаратами [7, 8]. В клинических испытаниях, немиелоаблативная (но лимфоаблативная) системная химиотерапия (Флударабин + Циклофосфамид) перед Т-клеточным переносом повышала процент объективных клинических ответов до 50%, при этом длительность ремиссий по сравнению с адоптивным переносом иммунокомпетентным пациентам также повышалась [9]. Важно отметить, что у ряда пациентов была отмечена быстрая и полная регрессия опухолевых очагов даже при распространенном заболевании с множественными висцеральными метастазами, рефрактерном к стандартным терапевтическим протоколам, таким как химио-, радио- и цитокиновая терапия [5]. Считается, что подобный эффект лимфодепрессии опосредован такими эффектами химио- и/или радиотерапии, как элиминация иммуносупрессивных клеток, таких как CD4⁺CD25⁺ регуляторные Т-клетки, минимизация эффекта «цитокинового слива» («cytokine sink»), при котором конкуренция перенесенных и присутствующих в организме иммунных клеток за ограниченные количества цитокинов и ростовых факторов приводит к снижению выживаемости адоптивно перенесенных Т-клеток *in vivo*, а также неспецифическая активация антигенпрезентирующих клеток микроорганизмами-комменсалами за счет нарушения естественных слизистых барьеров, прежде всего, кишечного эпителия [5].

В новом исследовании научной группы S. Rosenberg тестировались два новых миелоаблативных режима химиолучевой терапии, используемых перед адоптивным Т-клеточным переносом аутогенных опухолеспецифичных Т-клеток. Схемы трех режимов — немиелоаблативный (NMA, 43 пациента, использованы обновленные результаты по 35 пациентам, включенным в предыду-

щее исследование + 8 новых пациентов), миелоаблативный с облучением всего тела в дозе 2 Гр (TBI-2, 25 пациентов) и миелоаблативный с облучением всего тела в дозе 12 Гр (TBI-12, 25 пациентов). В миелоаблативном режиме с облучением всего тела в дозе 12 Гр облучение проводили фракциями по 2 Гр дважды в день на протяжении трех дней, предшествующих однократной болюсной инфузии Т-клеток. После адоптивного переноса все пациенты получали курс высокодозной терапии IL-2. Пациенты с миелоаблативными режимами также получали инфузии мобилизованных ГМ-КСФ аутогенных гемопоэтических стволовых CD34⁺-клеток крови 1 или 2 сут. спустя после адоптивного переноса Т-клеток. Дальнейшая поддерживающая терапия состояла из Триметоприма, Сульфаметоксазола и антигрибковой терапии; HSV — серопозитивные пациенты получали Валацикловир. При необходимости пациенты получали трансинфузии тромбоцитов или эритроцитов. Ответ на лечение классифицировался в соответствии с системой RECIST (response evaluation in solid tumors) как отсутствие ответа, частичный ответ или полный ответ через 4 нед. после трансинфузии Т-клеток и далее через регулярные промежутки времени.

Доля объективных клинических ответов в трех группах составила 21/43 (48,8%) в группе NMA, 13/25 (52%) в группе TBI-2 и 18/25 (72%) в группе TBI-12. Общая двухлетняя выживаемость составила 30% в группе NMA и 42% в группе TBI-2 (время наблюдения в группе TBI-12 было слишком мало для оценки этого показателя). У пациентов, отвечавших на лечение, наблюдали регрессию метастатических очагов практически во всех анатомических областях, включая головной мозг. Важно отметить, что среди 10 пациентов (4/43 (9,3%) в группе NMA, 1/25 (8%) в группе TBI-2 и 4/25 (16%) в группе TBI-12), которые демонстрировали полный ответ (полное исчезновение всех очагов опухоли по данным КТ/МРТ), все 10 на момент окончания исследования оставались в полной ремиссии (длительность ремиссий на момент окончания исследования составляла от 8 до 63 мес.).

В целом лечение хорошо переносилось пациентами, ожидаемое в силу миелоаблативности протокола угнетение кроветворения носило кратковременный характер и у большинства пациентов полностью восстанавливалось через 2 недели. Ассоциированная с лечением летальность (по всем трем протоколам суммарно) составила 1/93

(1,1%), причиной был сепсис на фоне нейтропении в результате перфорации кишечника (дивертикулярный абсцесс, не обнаруженный при включении в клиническое исследование).

Интересно, что среди различных фенотипических маркеров, исследованных в использованных для адоптивного переноса Т-клеточных клонках, единственным статистически значимо коррелирующим с наличием объективного клинического ответа параметром оказалась средняя длина теломер Т-клеточной популяции, использованной для трансинфузии. Важно также отметить, что ранее этой же группой было показано, что длина теломер коррелирует со временем персистенции адоптивно перенесенных опухолеспецифичных Т-клеток [10]. Это указывает на критическую значимость пролиферативного потенциала переносимых Т-лимфоцитов для успеха подобных протоколов клеточной терапии. Сывороточные уровни гомеостатических в отношении Т-клеток цитокинов IL-7 и IL-15 значительно повышались в ходе лимфо- и/или миелоабляции; финальные концентрации этих цитокинов в день адоптивного переноса статистически значимо отличались при сравнении групп TBI-12 и NMA.

В целом, данное исследование — логическое продолжение работ этой группы, успешно идущей по пути повышения агрессивности иммуноабляции, предшествующей адоптивному переносу. В ряду исследований, использовавших адоптивный перенос без иммунодепрессии, адоптивный перенос с немелоаблативной лимфодепрессией и, наконец, два мелоаблативных режима с использованием облучения всего тела в дозах 2 и 12 Гр, прослеживается отчетливая тенденция к увеличению доли объективных клинических ответов, в т. ч. полных (т. е. полная регрессия всех метастатических очагов) и длительности достигаемых ремиссий, однако в силу малой численности групп эти отличия между различными режимами не достигают статистической значимости. Закономерно ожидать от этой группы рандомизированных плацебо-контролируемых исследований изучаемых ими режимов, где окончательно станут ясны перспективы данных протоколов в лечении пациентов с распространенными меланомами, а также преимуществ и недостатков различных режимов иммуноабляции. Вполне возможно, что эти данные также найдут применение в протоколах переноса ТсR-трансгенных Т-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Romero P., Cerottini J.C., Speiser D.E. The human T-cell response to melanoma antigens. *Adv. Immunol.* 2006; 92: 187–224.
2. Stockert E., Jdger E., Chen Y. et al. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 1998; 187(8): 1349–54.
3. Huang S.K., Okamoto T., Morton D.L., Hoon D.S. Antibody responses to melanoma/melanocyte autoantigens in melanoma patients. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 111(4): 662–7.
4. Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 2004; 10(9): 909–15.
5. Gattinoni L., Powell D.J., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(5): 383–93.
6. Rosenberg S.A., Yannelli J.R., Yang J.C. et al. Treatment of patients

with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994; 86(15): 1159–66.

7. Cheever M.A., Greenberg P.D., Fefer A. Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. *J. Immunol.* 1980; 125(2): 711–4.

8. North R.J. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T-cells. *J. Exp. Med.* 1982; 155(4): 1063–74.

9. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002; 298(5594): 850–4.

10. Shen X., Zhou J., Hathcock K.S. et al. Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. *J. Immunother.* 2007; 30(1): 123–9.

Подготовил П.В. Белоусов

По материалам: Dudley M.E., Yang J.C., Sherry R. et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26(32): 5233–9