

НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Уникальная микроархитектоника тканевой ниши нейральных стволовых клеток млекопитающих

Соматические стволовые клетки (СК) — резиденты тканей взрослого организма — находятся в постоянном контакте со специфическим микроокружением, так называемой тканевой нишей (stem-cell niche), транслирующей внешние сигналы и регулирующей самообновление и дифференцировку СК. Ниша стволовых клеток представляет собой вполне определенную анатомо-физиологическую единицу, включающую как сами СК, так и взаимодействующие с ними клетки, компоненты внеклеточного матрикса и источники нейрогуморальных регуляторных сигналов: сосудистую сеть и нервные окончания [1]. Однако трехмерная реконструкция этой многокомпонентной системы по данным микроскопии стандартных гистологических препаратов затруднена, поскольку многие важные структурные элементы теряются в срезах тканей. Данная проблема особо актуальна в случае воссоздания микроархитектоники ниши для нейральных стволовых клеток (НСК), где многочисленные отростки нейронов и глиальных клеток, разветвленные капилляры и молекулы внеклеточного матрикса создают чрезвычайно сложную сеть.

Постнатальный нейрогенез в головном мозге млекопитающих, включая человека, отмечается в двух специфических областях: субвентрикулярной зоне (СВЗ) боковых желудочков, где локализованы клетки-предшественники нейронов обонятельных луковиц, и субгранулярной зоне (СВЗ) зубчатой извилины гиппокампа, где образуются гранулярные нейроны, участвующие в поддержании памяти [2]. Непрерывная фоновая пролиферация клеток в обеих областях происходит на протяжении всей жизни, постепенно угасая к старости [3]. Расположенная под слоем эпендимных (Е) клеток СВЗ — наиболее крупная нейрогенная область, которая содержит стволовые и дифференцирующиеся клетки. Так, редко делящиеся GFAP⁺ астроцитоподобные стволовые клетки (клетки типа В) дают начало активно пролиферирующим DLX2⁺ С-клеткам — транзитным амплифицирующимся клеткам. Последние образуют коммитированные к дифференцировке β -III-тубулин⁺ PSA-NCAM⁺ DLX2⁺ нейробласты (А-клетки), которые цепочками мигрируют в направлении обонятельной луковицы, где дифференцируются в ингибиторные нейроны.

Следует отметить, что в эмбриогенезе нейрогенные стволовые клетки — клетки радиальной глии — контактируют с полостью нервной трубки, откуда получают регуляторные сигналы, необходимые, в частности, для контроля асимметричного деления [4]. Лишь в постнатальном организме стволовые клетки перемещаются вглубь —

в субвентрикулярную зону, оказываясь ограниченными от желудочков слоем эпендимных клеток. Поэтому до недавнего момента оставалось неясным, каким образом внешние сигналы контролируют пролиферацию нейрогенных СВЗ-астроцитов, изолированных с одной стороны плотным эпендимным слоем, а с другой — гематоэнцефалическим барьером, непроницаемым для большинства регуляторных молекул.

Существенного прорыва в изучении структурной организации нейрогенных зон во взрослом головном мозге мышей удалось достигнуть тесно сотрудничающим группам исследователей под руководством А. Alvarez-Buylla, J.M. Garcia-Verdugo, F. Doetsch и S. Temple. Сразу три работы, опубликованные в сентябрьском номере журнала Cell Stem Cell, пролили свет на важные детали трехмерной структуры и функциональной регуляции ниши НСК. Визуализация взаимодействий в нише НСК стала возможной благодаря использованию современных подходов в сканирующей конфокальной микроскопии, позволяющих проводить анализ по всему объему гистологического среза (whole-mount imaging). В раннем совместном исследовании [5] с той же целью F. Doetsch, J.M. Garcia-Verdugo и А. Alvarez-Buylla использовали электронную микроскопию

Z. Mirzadeh с соавт. (группа Arturo Alvarez-Buylla) смогли выяснить несколько уникальных аспектов организации нейрогенной субвентрикулярной зоны. Во-первых, авторы обнаружили, что с полостью бокового желудочка апикальными мембранами контактируют три типа реснитчатых клеток: 1) нейрогенные В1-клетки с короткой одиночной ресничкой, 2) эпендимные (Е1) клетки с множеством (около 50) длинных ресничек и 3) ранее не описанные эпендимные (Е2) клетки с двумя длинными ресничками и комплексными базальными тельцами. Авторы полагают, что реснички на апикальной мембране обнаруженных Е2-клеток могут служить сенсорами химических и механических сигналов, поступающих из циркулирующей в желудочках спинномозговой жидкости. Фенотип клеток также различался: на апикальной поверхности В1-клеток отмечена экспрессия маркерной молекулы нейральных стволовых клеток GFAP (glial fibrillary acidic protein), а также нестина и CD133, в то время как Е1- и Е2-клетки были GFAP⁻/CD24⁺/S100 β ⁺. Контактующие с боковым желудочком В1-клетки были обнаружены только в латеральной и передней медиальной его стенках, в отличие от клеток эпендимы, выстилающих поверхность желудочков головного мозга. По всей видимости, субпопуляция апикальных астроцитов



присутствует в субвентрикулярной зоне головного мозга человека [6]. Наличие популяции апикальных В1-клеток, контактирующих с желудочком, было также подтверждено в исследовании группы S. Temple.

Особенно интересно, что апикальные поверхности В1-клеток и клеток эпендимы сгруппированы особым образом в кластеры, напоминающие цветок или колесо (pinwheel): в центре располагаются одна или несколько апикальных мембран В1-клеток, окруженных плотным кольцом эпендимных клеток. Отмечено, что контакты между В1-клетками и В1- и Е-клетками, по-видимому, участвуют в контроле симметричного и асимметричного деления НСК, а также ответственны за формирование характерных колесовидных кластеров в постнатальный период. Таким образом, авторам удалось ответить на вопрос, каким образом нейрогенные астроциты, тела которых расположены в субвентрикулярной зоне, могут получать регуляторные сигналы из желудочка. Неудивительно, что В1-клетки, контактирующие с желудочком своей апикальной мембраной, долгое время не удавалось обнаружить методами электронной микроскопии. Как оказалось, средняя площадь апикальной поверхности В1-клеток составляет 24,1 мкм², что более чем в 10 раз меньше, чем площадь апикальной поверхности эпендимных клеток (265,0 мкм²). Поэтому до недавнего момента считалось, что хотя одиночные В1-клетки могут контактировать с полостью желудочка, такие взаимодействия скорее исключение, чем правило [7]. Однако, несмотря на малую площадь контакта, В1-клетки составляют приблизительно одну треть от всех клеток, контактирующих с желудочком, и поэтому могут рассматриваться как важнейшая клеточная популяция эпендимного слоя.

Во-вторых, Z. Mirzadeh и коллеги подтвердили нейрогенные свойства популяции GFAP⁺ В1-клеток, контактирующих с желудочком [8]. Выяснилось, что в головном мозге взрослых мышей значительная часть этих клеток митотически активна, о чем свидетельствовала окраска фосфорилированного гистона H3 (клетки в фазе митоза) и маркера пролиферации Ki67. Кроме того, генетически меченные GFAP⁺ В1-клетки образовывали нейробласты и дифференцировались в нейроны, астроциты и олигодендроциты *in vivo* и *in vitro*.

В-третьих, группа A. Alvarez-Buylla проследила судьбу длинных базальных отростков, отходящих от GFAP⁺ В1-клеток. Реконструкция крупных стеков изображений, полученных в результате конфокального сканирования латеральной стенки бокового желудочка 50-мкм толщины, показала, что абсолютное большинство (более 96 %) GFAP-позитивных астроцитов с базальным отростком также имеют апикальную поверхность, взаимодействующую с полостью желудочка, а их базальные отростки, в свою очередь, контактируют с поверхностью кровеносных сосудов. Более того, базальные отростки нейрогенных В1-клеток формируют каналы, по которым цепочками мигрируют дифференцирующиеся нейробласты. Таким образом, авторы работы продемонстрировали, что В1-клетки — стволовые клетки центральной нервной системы — обладают уникальной полярной организацией: апикальной поверхностью эти клетки взаимодействуют с полостью желудочка, а длинным базальным отростком — с эндотелием сосудов. Схожую морфологию имеют эмбриональные предшественники В1-клеток — клетки радиальной глии [2], что еще раз подчеркивает их преемственность. С другой стороны, многополярные GFAP-позитивные В2-клетки, локализующиеся под пучками отростков нейрогенных астроцитов, в отличие

от последних, характеризуются сильно разветвленными, многочисленными отростками (Shen и коллеги в своей работе обозначили такие клетки как «В-клетки глубокого слоя»).

M. Tavazoie с соавт. (группа Fiona Doetsch) и Q. Shen с соавт. (группа Sally Temple) основное внимание уделили описанию взаимодействий клеток субвентрикулярной зоны с сосудистой сетью (так наз. сосудистая ниша НСК). Редко ветвящиеся сосуды в СВЗ расположены в одной плоскости прямо под эпендимным слоем, обычно на расстоянии 10–20 мкм от его поверхности (Q. Shen с соавт.). Оказалось, что абсолютное большинство делящихся Ki67⁺ клеток субвентрикулярной зоны располагаются в непосредственной близости от сосудистого сплетения (преимущественно капилляров). Следует отметить, что в отличие от второй нейрогенной зоны головного мозга — субгранулярной [9], эндотелиальным клеткам сосудов в СВЗ не свойственна пролиферативная активность.

Используя трансгенных мышей, клетки которых экспрессируют флуоресцентный маркер GFP под контролем промотора гена GFAP, M. Tavazoie с соавт. выяснили, что лишь некоторые Ki-67-позитивные клетки представляют собой GFAP⁺ астроциты, около половины из которых (51,2%) напрямую контактирует с эндотелием сосудов. Shen с соавт. использовали дополнительный маркер LeX для визуализации нейрогенных В1-клеток и пришли к сходным результатам: около 70% GFAP⁺/LeX⁺ клеток находились в 5 мкм от сосудов. Для идентификации медленно делящихся НСК *in situ* авторы обеих работ вводили мышам ДНК-метку (бромодезоксиуридин, BrdU). Анализ, проведенный M. Tavazoie с соавт. через 6 нед. после введения метки показал, что 55,4% клеток, накапливающих BrdU (label-retaining cells), были локализованы вблизи сосудов, при этом среднее расстояние GFAP⁺/BrdU⁺ стволовых клеток до сосудов составило 11,2 мкм. Аналогичный результат (55,5% BrdU-накапливающих клеток в 10 мкм от сосудов) получила группа S. Temple (анализ проводился через 24 сут). Еще ближе к сосудистой сети субвентрикулярной зоны (8,8 мкм) находились транзитные амплифицирующиеся С-клетки, экспрессировавшие EGFR и Mash1 (в исследовании Q. Shen с соавт. 44% С-клеток с фенотипом LeX⁺/GFAP⁻ локализовались в 5 мкм от поверхности сосудов). С другой стороны, разветвленные цепочки DLX2⁺/PSA⁺/NCAM⁺ нейробластов лишь в некоторых местах приближались к сосудам, в целом формируя собственную независимую сеть. Только в дорсальной части СВЗ сосуды сопровождали цепочки нейробластов, мигрирующих в направлении обонятельной луковицы.

M. Tavazoie с соавт. показали, что молекулярные факторы, присутствующие в периферической крови, могут проникать через стенки сосудов в субвентрикулярную зону и таким образом регулировать функциональную активность НСК и клеток-предшественников. Так, в СВЗ и других перивентрикулярных областях боковых желудочков активно накапливались введенные в общий кровоток молекулы флуоресцеина (376 Да). Особенно важным оказался тот факт, что в местах контакта сосудов с клетками субвентрикулярной зоны гемато-энцефалический барьер характеризуется повышенной проницаемостью. Действительно, в некоторых местах сосуды лишены оболочки из перicyтов (NG2⁺/десмин⁺) и ножек астроцитов (экспрессируют аквапорин-4). Интересно, что 38% С-клеток контактировали с сосудами именно в тех местах, где отсутствовали астроцитарные ножки, а 70% EGFR⁺ С-клеток — в местах, где не было перicyтарной оболочки. Кроме того, было обнаружено,

что ZO-1⁺ плотные контакты между эндотелиальными клетками, обеспечивающие низкую проницаемость гематоэнцефалического барьера [10], также могут отсутствовать на небольших участках сосудов.

Исследования группы S. Temple позволили выяснить, какие молекулы обеспечивают контакт стволовых B1-клеток с эндотелием сосудов субвентрикулярной зоны. Оказалось, что $\alpha\beta\beta 1$ -интегрин; — рецептор к ламинину, одному из основных компонентов базальной мембраны, окружающей сосуда, активно экспрессируется на LeX⁺/GFAP⁺ клетках, расположенных вблизи сосудов, а также на LeX⁺ клетках нейросфер, образующихся при культивировании нейрональных клеток-предшественниц. Более того, введение антител, блокирующих связывание $\alpha\beta$ -интегрин с молекулами ламинина, в боковые желудочки взрослых мышей приводило к откреплению клеток от сосудов и стимулировало их пролиферацию, что свидетельствовало о функциональной значимости контакта нейральных стволовых клеток с базальной мембраной сосудов *in vivo*.

Взаимодействие с сосудами также оказалось необходимым для клеточной регенерации в субвентрикулярной зоне (группа F. Doetsch). Проплиферация стволовых клеток, вызванная гибелью C-клеток и нейробластов под действием цитозин- β -D-арабинофуранозид (Ara-C), была тесно ассоциирована с сосудистой сетью (более 60% BrdU⁺ клеток непосредственно контактировали с сосудами).

Стоит отметить, что ассоциация с эндотелиальными клетками сосудов была обнаружена и для других тканеспецифических стволовых клеток, к примеру, для гемопоэтических стволовых клеток [11] и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [12]. Взаимодействие с сосудами, по-видимому, требуется для более эффективного распознавания сигналов, поступающих от циркулирующих в крови молекулярных факторов.

Таким образом, нейральные стволовые клетки могут получать регуляторные сигналы от двух источников. Во-первых, апикальная поверхность НСК может служить сенсором растворимых факторов, присутствующих в спинномозговой жидкости боковых желудочков. Во-вторых, длинные отростки, отходящие от базальной части, контактируют с базальной мембраной сосудов, где могут воспринимать сигналы от эндотелиальных и периваскулярных клеток (например, VEGF, FGF2, IGF1, BDNF), базальной мембраны (ламинин) и небольших молекул, циркулирующих в крови. Взаимодействие НСК с сосудами происходит в уникальных сайтах, которые лишены типичных структур гематоэнцефалического барьера и поэтому проницаемы для молекул, присутствующих в кровяном русле.

Обнаружение высокопроницаемых участков сосудистого эндотелия, с которыми контактируют НСК и клетки-предшественники, в субвентрикулярной зоне говорит о повышенной чувствительности нейрогенных клеток к химическим агентам, присутствующим в периферической крови, как лекарственным, так и токсическим, что следует в дальнейшем учитывать при разработке и тестировании лекарственных препаратов. Кроме того, изучение тонких механизмов контроля функциональной активности стволовых клеток в естественном микроокружении открывает новые возможности для регенеративной медицины. В частности, большие надежды возлагаются на неинвазивные терапевтические подходы, предполагающие модуляцию активности эндогенных СК *in situ* посредством введения специфических фармакологических агентов и рекомбинантных факторов [13]. Поэтому первостепенную значимость для дальнейших исследований представляет обнаружение конкретных молекулярных факторов, способных проникать к клеткам субвентрикулярной зоны из крови и спинномозговой жидкости и регулировать активность НСК.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Scadden D.T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006; 441(7097): 1075–9.
2. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 2003; 6(11): 1127–34.
3. Luo J., Daniels S.B., Lenington J.B., Notti R.Q., Conover J.C. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 2006; 5(2): 139–52.
4. Kosodo Y., Ruper K., Haubensak W. et al. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.*; 23(11): 2314–24.
5. Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 1997; 17(13): 5046–61.
6. Sanai N., Tramontin A.D., Quicones-Hinojosa A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004; 427(6976): 740–4.

7. Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *PNAS* 1999; 96(20): 11619–24.
8. Doetsch F., Caillaud I., Lim D.A., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97(6): 703–16.
9. Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp Neurol.* 2000; 425(4): 479–94.
10. Abbott N.J., Rønnback L., Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7(1): 41–53.
11. Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T. et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005; 121(7): 1109–21.
12. 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.
13. Lindvall O., Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 2006; 441(7097): 1094–6.

Подготовил А.А. Леявский

По материалам: Mirzadeh Z., Merkle F.T., Soriano-Navarro M., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 265–78. Tavazoie M., Van der Veken L., Silva-Vargas V. et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 279–88. Shen Q., Wang Y., Kokovay E. et al. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 289–300

Раскрыт механизм старения нейральных стволовых клеток

Нейральные стволовые клетки (НСК) расположены в субвентрикулярной зоне боковых желудочков мозга млекопитающих. В отличие от дифференцированных клеток нервной ткани, НСК способны дифференцироваться в любой из двух основных типов нервных клеток (нейроны и клетки глии — астроциты и олигодендроциты). Такие свойства, как дифференцировка и самообновление, позволяют НСК участвовать в репарации нервной ткани [1]. К сожалению, способность НСК и стволовых клеток других типов к самообновлению ухудшается по мере старения организма [2].

На данный момент известно несколько генов, экспрессия которых необходима стволовым клеткам для самообновления. Например, продукт гена *Bmi1* необходим для самообновления стволовых кроветворных клеток (СКК) и НСК во взрослом организме [3, 4]. Функция *Bmi1* заключается в репрессии локуса *INK4a/ARF* (называемого также *CDKN2A*), кодирующего два ингибитора клеточного цикла — *INK4a* и *ARF*. Данный локус должен быть выключен в СКК и НСК, поскольку самообновление стволовой клетки подразумевает прохождение через клеточный цикл.

По мере старения организма уровень экспрессии локуса *INK4a/ARF* повышается, делая невозможным самообновление стволовых клеток. Учитывая, что уровень экспрессии *Bmi1* на протяжении жизни практически не меняется, ген, отвечающий за возрастное уменьшение потенциала самообновления до последнего времени оставался загадкой.

Поиском данного гена занялась группа ученых под руководством Шона Моррисона. Ученые решили начать поиск со стволовых клеток крови, поскольку наличие хорошо охарактеризованных поверхностных маркеров позволяет выделить эти клетки в чистом виде, используя метод FACS.

Ученые выделили СКК из печени эмбриона мыши (популяция *Thy-1^{low}Sca-1⁺Lineage⁻Mac-1⁺*), костного мозга новорожденных и взрослых мышей (популяция *Thy-1^{low}Sca-1⁺Lineage⁻Mac-1⁺c-kit⁺*) и проанализировали их профили транскрипции. Для этого из СКК выделили РНК, провели обратную транскрипцию и амплификацию, после чего подвергали гибридизации с олигонуклеотидными экспрессионными биочипами (Аффиметрикс).

Сравнение транскриптомов «молодых» и «старых» СКК показало, что лишь один ген — *Hmga2*, активно экспрессируется в СКК эмбриона и постепенно ингибируется по мере старения мыши. Используя метод количественной ПЦР, ученые обнаружили аналогичную закономерность в экспрессии *Hmga2* в НСК. Таким образом, изменение уровня экспрессии гена *Hmga2* с возрастом являются общей чертой по крайней мере двух типов стволовых клеток.

Ген *Hmga2* (High Mobility Group AT-hook 2) кодирует белок, ассоциированный с хроматином за счет своего ДНК-связывающего домена. Белок *Hmga2* входит группу HMG-белков, функция которых заключается в организации структуры хроматина и контроле экспрессии генов. Ранее было показано, что мутации в гене *HMGA2* человека оказывают влияние на рост индивидуума [5]. Это наблюдение подтвердилось и на мышинной модели. Мыши с нокаутом гена *Hmga2* (*Hmga2^{-/-}*) жизнеспособны, однако меньше по размеру и развиваются медленнее,

чем мыши дикого типа. Все это указывает на то, что *Hmga2* может играть важную роль в развитии организма. Но какую? Ученым из группы Шона Моррисона удалось ответить на этот вопрос: фактор *Hmga2*, как и *Bmi1*, ингибирует экспрессию локуса *INK4a/ARF*. Если в «молодых» НСК много *Hmga2* и мало *INK4a* и *ARF*, то в «старых» НСК количество *Hmga2* уменьшается, а *INK4a* и *ARF* возрастает. Такая закономерность может объяснить почему по мере старения НСК теряют способность к самообновлению.

Для того, чтобы подтвердить предполагаемую роль гена *Hmga2* в функционировании стволовых клеток ученые выделили НСК из *Hmga2^{-/-}* мыши и проверили их способность к дифференцировке и самообновлению *in vitro*. В отличие от дифференцированных клеток нервной ткани, НСК, помещенные в чашку с ростовой средой, продолжают делиться и образуют шарообразные колонии (нейросферы). По размеру нейросфер можно судить о потенциале самообновления НСК. В то же время, НСК способны к спонтанной дифференцировке в культуре. По количеству и соотношению дифференцированных клеток в культуре нейросфер можно судить о потенциале дифференцировки НСК (подробнее см. [6]). Ученые обнаружили, что *Hmga2^{-/-}* НСК обладают таким же потенциалом дифференцировки, что и НСК дикого типа, однако образуют нейросферы меньшего размера. Это означает, что при отсутствии гена *Hmga2* у нейральных стволовых клеток ухудшается способность к самообновлению.

К аналогичным выводам ученые пришли, изучая *Hmga2^{-/-}* НСК *in vivo*. НСК являются единственными митотическими активными клетками нервной ткани, благодаря чему их можно легко выявить с помощью специальной метки — бромдезоксифуридина (БрДУ). БрДУ представляет собой нуклеотидный аналог, способный включаться в цепь ДНК во время репликации. Таким образом, добавив в рацион мыши БрДУ, можно пометить все делящиеся клетки, в том числе и НСК. Ученые окрасили срезы мозга *Hmga2^{-/-}* мышей и мышей дикого типа с помощью специальных антител против БрДУ и обнаружили, что количество митотически активных клеток в субвентрикулярной зоне мозга уменьшается при отсутствии *Hmga2*. Таким образом, *Hmga2* влияет на пролиферативный потенциал НСК *in vivo*.

Если функция *Hmga2* заключается в инактивации ингибиторов клеточного цикла, закодированных в локусе *INK4a/ARF*, то можно предположить, что делеция данного локуса можно компенсировать, дополнительно удалив данный локус. И действительно, было показано, что у двойного нокаута *Hmga2^{-/-}INK4a/ARF^{-/-}* количество НСК в субвентрикулярной зоне мозга такое же, как у дикого типа.

Как же регулируется экспрессия гена *Hmga2*? Оказывается, в этом процессе участвуют микро-РНК. В нетранслируемой 3'-области гена *Hmga2* расположены сайты узнавания микро-РНК *let-7*. Ученые измерили экспрессию *let-7* и обнаружили, что экспрессия этой микро-РНК в НСК мышей увеличивается с возрастом.

Таким образом, группа Моррисона предлагает следующую модель. В стволовых клетках зародышей и молодых особей интенсивно экспрессируется ген *Hmga2*, который выключает ингибиторы клеточного цикла *ARF* и *INK4a* и позволяет клеткам делиться. По мере старения

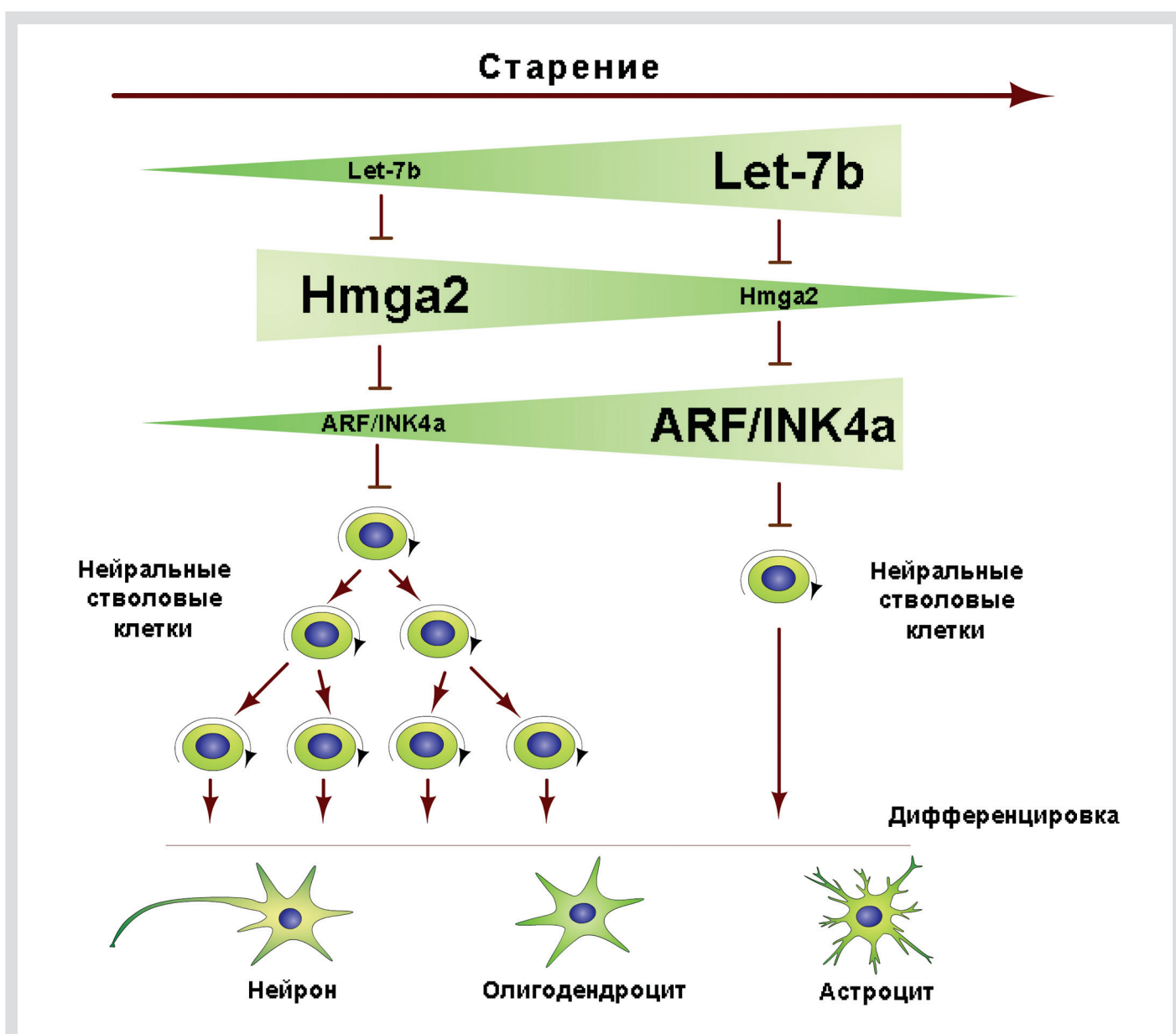
стволовых клеток активируется микро-РНК let-7, которая ингибирует экспрессию гена Hmga2. Выключение гена Hmga2 приводит к активации ARF и INK4a, остановке клеточного цикла и потере стволовыми клетками способности к самообновлению (рис.).

В чем заключается биологический смысл такой регуляции? Возможно, ограничивая потенциал пролиферации стволовых клеток по мере их старения и тем самым принося в жертву способность тканей к восстановлению, природа пытается предотвратить неконтролируемый рост. С возрастом в клетках накапливаются мутации, поэтому рано или поздно стволовая клетка превратится в раковую, если, конечно, нет механизмов вовремя остановить ее деление. Такое объяснение кажется тем более вероятным, что известно, что Hmga2 является протоонкогеном. Перестройки гена Hmga2 характерны для некоторых раковых заболеваний. Примечательно, что при этом ген Hmga2 теряет участок комплементарный микро-

РНК let-7 и избавляется при этом от let-7 зависимой репрессии [7].

Итак, группа Шона Моррисона продемонстрировала новый механизм регуляции стволовых клеток мыши. Однако, на ряд вопросов так и не получено ответов. Например, работает ли этот механизм у человека? Если да, то можно ли его обойти? Почему экспрессия let-7 увеличивается с возрастом?

Шон Моррисон также сохраняет молчание по поводу возможного применения результатов исследования в медицине. Кажется очевидным, что отключая Hmga2-зависимый механизм контроля самообновления НСК, можно спровоцировать рак. Однако, если выключить этот механизм локально и на короткое время, недостаточное для трансформации стволовых клеток в раковые, то может быть, получится добиться восстановления поврежденной ткани у пожилых пациентов. Осуществимо ли это, покажут результаты будущих исследований.



Модель влияния возраста на потенциал самообновления нейральных стволовых клеток, предложенная группой доктора Ш. Моррисона. В НСК мыши с возрастом увеличивается экспрессия микро-РНК let-7, что приводит к уменьшению экспрессии гена Hmga2. Hmga2 ингибирует экспрессию локуса INK4a/ARF. В результате, с возрастом у НСК увеличивается экспрессия ингибиторов клеточного цикла ARF и INK4a, что приводит к снижению потенциала самообновления

ЛИТЕРАТУРА:

1. Basak O., Taylor V. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol. Life Sci.* 2008 Nov 18. Epub ahead of print.
2. Beausejour C.M., Campisi J. Ageing: balancing regeneration and cancer. *Nature* 2006; 443(7110): 404–5.
3. Lessard J., Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 2003; 423(6937): 255–60.
4. Molofsky A.V., Pandal R., Iwashita T., Park I.K., Clarke M.F., Morrison S.J. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003; 425(6961): 962–7.

5. Weedon M.N., Lettre G., Freathy R.M. et al. A common variant of HMGA2 is associated with adult and childhood height in the general population. *Nature genetics* 2007; 39(10): 1245–50.
6. Vescovi A.L., Galli R., Reynolds B.A. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6(6): 425–36.
7. Fusco A., Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7(12): 899–910.
8. Nishino J., Kim I., Chada K., Morrison S.J. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf expression. *Cell* 2008; 135(2): 227–39.

Подготовил П.В. Дмитриев

По материалам: Nishino J., Kim I., Chada K., Morrison S.J. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf expression. *Cell* 2008; 135(2): 227–39

Ограниченный опухолеогенный потенциал CD34⁺CD38⁺ трансформированных клеток при остром миелобластном лейкозе является артефактом

В исследованиях последних лет было обнаружено, что в составе общей массы трансформированных клеток при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) у человека существует малочисленная популяция лейкозных стволовых клеток (ЛСК). Серийная трансплантация именно этой популяции клеток приводит к возникновению ОМЛ у иммунодефицитных мышей-реципиентов, тогда как опухолеогенный потенциал других популяций опухолевых клеток ограничен [1]. ЛСК имеют фенотипическое и функциональное сходство со стволовыми кроветворными клетками (СКК) и, как было показано, обладают большой резистентностью к применяемой для лечения ОМЛ химиотерапии и, вероятно, являются источником рецидивов [2]. В связи с этим, ЛСК привлекли особое внимание ученых и клиницистов, так как разработка методов терапии, направленных на их уничтожение, может привести к революции в лечении ОМЛ, а также целого ряда других гематологических и солидных злокачественных новообразований.

Тщательное изучение биологии ЛСК сталкивается со значительными трудностями, что прежде всего обусловлено малочисленностью этой популяции клеток. Изоляция ЛСК стала возможна только при использовании высокоэффективной сортировки «клеток-кандидатов» на основании паттерна экспрессируемых на поверхности антигенов методом FACS [3]. В качестве реципиентов при последующих трансплантациях, как правило, используются мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (NOD/SCID), которые характеризуются рядом выраженных дефектов в T-, B-, NK-клетках и системе комплемента, что позволяет использовать их в качестве универсальных «биореакторов» [4]. Именно при использовании этой линии мышей было показано, что ЛСК при ОМЛ имеют иммунофенотип CD34⁺CD38⁺, тогда как CD34⁺CD38⁺ клетки характеризуются низкой опухолеогенной активностью [3].

Тем не менее, не все исследователи признают адекватность используемой экспериментальной модели. В частности группа D. Bonnet установила, что используемые для идентификации клеток и дальнейшей сортировки антитела могут значительно исказить результаты

по репопулирующей активности гемопоэтических предшественников и ЛСК в NOD/SCID мышам [7]. В настоящем исследовании они провели более детальный анализ вероятных артефактов, связанных с использованием антител при изучении опухолеогенного потенциала разных популяций злокачественных клеток ОМЛ при их трансплантации NOD/SCID мышам.

На первом этапе изучалось влияние инкубации мононуклеарных клеток (пуговинной крови или ОМЛ) с антителами к одному из антигенов (CD34, CD45, CD13, CD123, CD3, CD20 и CD38) или изотипическими контрольными антителами, проводимой непосредственно перед отмыванием и трансплантацией мышам. Инкубация с антителами к CD34, CD45, что было объяснимо, и CD38, что было удивительно, приводила к значительному снижению приживления мононуклеарных клеток. При этом эффект анти-CD38 антител проявлялся быстро; количество окрашенных РКН26 мононуклеарных клеток пуговинной крови стремительно снижалось уже через 16 час. после трансплантации. Кроме того, анти-CD38 антитела снижали опухолеогенный потенциал мононуклеарных клеток ОМЛ в среднем более, чем в 500 раз.

С целью определения обусловлен ли эффект антител взаимодействием их Fc-фрагментов с рецепторами на клетках иммунной системы реципиентов, мононуклеарные клетки инкубировались как с целыми молекулами анти-CD38 антител, так и с F(ab)2-фрагментами этих же антител. Степень приживляемости была значительно выше у клеток, обработанных F(ab)2-фрагментами. Следовательно, ингибирующий эффект анти-CD38 антител был в значительной степени обусловлен их взаимодействием с Fc-рецепторами на поверхности клеток реципиентов, несмотря на наличие у мышей многочисленных дефектов иммунной системы.

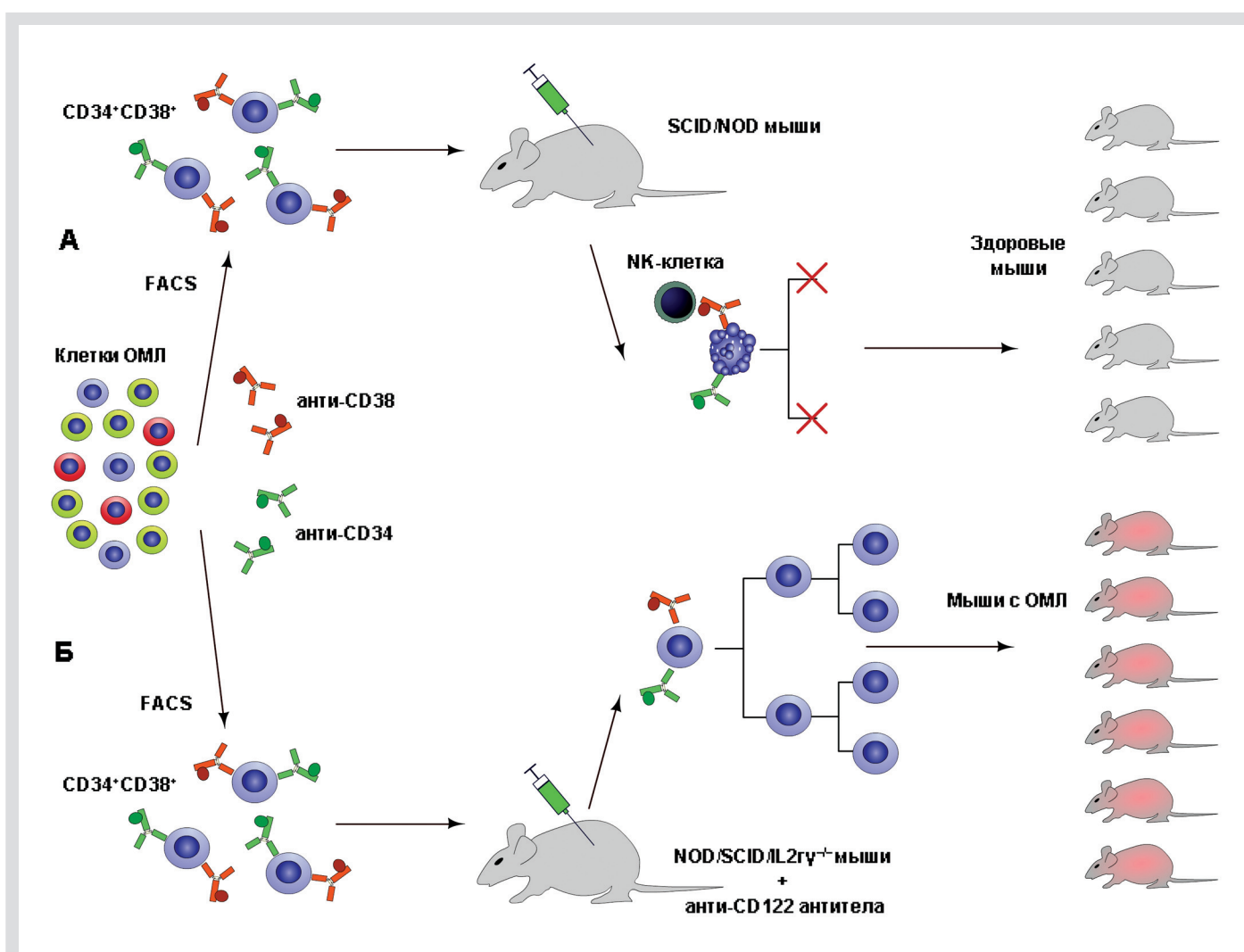
Ингибирующий эффект антител к CD38 уменьшается при предварительном введении NOD/SCID мышам иммуносупрессивных антител. Обработка антителами к CD122 (CD122 — β-цепь рецептора к IL-2), вызывающих истощение NK-клеток и частично моноцитов/макрофагов [5], не только предотвращала ингибирующий эффект инкубации с анти-CD38 антителами, но и приводила

к значительному увеличению приживляемости мононуклеарных клеток как пуповинной крови, так и ОМЛ. Аналогичные, хотя и намного менее выраженные результаты были получены при использовании в качестве реципиентов NOD/SCID мышей с более выраженными врожденными дефектами иммунной системы — мыши NOD/SCID с нокаутированными генами β -микроглобулина (NOD/SCID/ $\beta 2m^{-/-}$) и мыши NOD/SCID с нокаутированными генами гамма-цепи рецептора к IL-2 (NOD/SCID/IL2 $\gamma^{-/-}$).

Обнаружив выраженный ингибирующий эффект предварительной инкубации с анти-CD38 антителами на приживление мононуклеарных клеток ОМЛ, авторы пришли к выводу, что, несмотря на ранее полученные данные [3, 6], существуют экспрессирующие CD38 популяции ЛСК. В противном случае ингибирующий эффект анти-CD38 антител был труднообъясним. Чтобы доказать эту гипотезу, они использовали наиболее иммунодефицитные линии мышей, которые помимо этого были подвергнуты дополнительной иммуносупрессии анти-CD122 антителами, что позволило избежать ингибирующий эф-

фект анти-CD38 антител. Путём внутрикостномозгового введения животным трансплантировались $CD34^{+}CD38^{+}$ и $CD34^{+}CD38^{-}$ фракции клеток, полученных из 7 образцов костного мозга больных с ОМЛ. При анализе результатов через 8-11 недель было выявлено приживание клеток от всех 7 образцов и развитие ОМЛ у 19 из 21 мыши, которым производилось введение клеток с фенотипом $CD34^{+}CD38^{+}$. В параллельной группе с трансплантацией $CD34^{+}CD38^{-}$ клеток для четырёх из семи образцов ОМЛ не удалось выявить приживание трансплантата, мышь с пятым образцом умерла до осуществления анализа, у мыши с шестым образцом развился ОМЛ, тогда как у мыши с 7 образцом был обнаружен химеризм клеток крови, но убедительных данных о наличии ОМЛ получено не было.

Таким образом, в данном исследовании было показано, что анти-CD38 антитела оказывают выраженный ингибирующий эффект на репопулирующий потенциал СКК и опухоленную активность ЛСК при их трансплантации NOD/SCID мышам (см. рис.).



Использование анти-CD38 антител и SCID/NOD мышей является причиной ограниченного опухолевого потенциала $CD34^{+}CD38^{+}$ клеток ОМЛ. В предыдущих исследованиях с использованием SCID/NOD мышей в качестве реципиентов было показано, что $CD34^{+}CD38^{+}$ популяция клеток ОМЛ имеет ограниченный опухолевый потенциал (А). Однако в настоящей работе, где использовались мыши с более выраженным угнетением иммунной системы, трансплантация $CD34^{+}CD38^{+}$ опухолевых клеток приводила к возникновению лейкоза практически у все реципиентов. Авторы продемонстрировали, что основной причиной выявленного артефакта является взаимодействие Fc-фрагментов антител, в основном анти-CD38, с Fc-рецепторами клеток иммунной системы SCID/NOD мышей (вероятно NK-клетками). Более глубокое угнетение иммунной системы мышей приводило к отмене этого взаимодействия, в результате чего проявлялся опухолевый потенциал $CD34^{+}CD38^{+}$ клеток ОМЛ (Б)

Этот эффект, вероятно, обусловлен распознаванием Fc-фрагментов антител экспрессирующими Fc-рецептор иммунными клетками реципиента, что в конечном итоге является фатальным для трансплантированных клеток. Менее выраженное, хотя и значительное, влияние анти-CD38 антител наблюдалось при трансплантации NOD/SCID мышам с более выраженными врожденными дефектами NK-клеток, свидетельствуя об их роли в подавлении меченных антителами клеток.

Недооценка роли иммунной системы NOD/SCID мышей в предыдущих исследованиях привела, по-видимому, к ошибочному мнению, что ЛСК при ОМЛ локализируются исключительно в популяции CD34⁺CD38⁻клеток. В настоящем исследовании было показано, что ЛСК гораздо более гетерогенны и популяция CD34⁺CD38⁺ может иметь более выраженную опухолевую активность. Тем не менее, для окончательного ответа на этот вопрос необходимо проведение послед-

овательной серийной трансплантации CD34⁺CD38⁺ клеток, что позволит определить их ограниченный или неограниченный потенциал к пролиферации.

Основным достижением исследования является вывод, что метод сортировки клеток на основании паттерна выявляемых антителами структур методом FACS и последующей серийной трансплантации выделенных клеток NOD/SCID мышам не является оптимальным для изучения туморогенного потенциала разных популяций опухолевых клеток. Необходима разработка модификаций метода, в которых, например, использовались бы мыши-реципиенты с более выраженными дефектами иммунной системы или вместо целых антител применялись бы только F(ab)2-фрагменты. В свете новой информации также необходим пересмотр многочисленных данных об опухолевых стволовых клетках при других новообразованиях, которые были получены с использованием аналогичной экспериментальной модели.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bhatia M., Wang J.C., Kapp U., Bonnet D., Dick J.E. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *PNAS* 1997; 94: 5320–5.
2. Krause D., Van Etten R. Right on target: eradicating leukemic stem cells. *TRENDS in Molecular Medicine* 2007; 13(11): 470–81.
3. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464): 645–8.
4. Shultz L., Schweitzer P., Christianson S. et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.*

1995; 154: 180–91.

5. Tanaka T., Kitamura F., Nagasaka Y. Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 1103–7.

6. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997; 3: 730–7.

7. Taussig D.C., Pearce D.J., Simpson C. et al. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106: 4086–92.

Подготовил И.Л. Пласа

По материалам: Taussig D., Miraki-Moud F., Anjos-Afonso F. et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 2008; 112: 568–575

Новые данные о хромосомных aberrациях, возникающих в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе культивирования

При культивировании эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека необходимо проводить постоянный мониторинг их кариотипа, поскольку в процессе культивирования *in vitro* в ЭСК нередко возникают хромосомные aberrации [1–3], такие как анеуплоидии — потери или, напротив, приобретения лишних хромосом в диплоидном хромосомном наборе. Логично предположить, что подобные изменения генома клетки могут влиять на ее пролиферацию как в сторону ее усиления, так и подавления, способность к спонтанной дифференцировке в том или ином направлении, а также приводить к злокачественной трансформации. По этой причине изменения кариотипа ЭСК снижают воспроизводимость и достоверность результатов научных экспериментов, приводя к многочисленным артефактам, а также являются серьезным препятствием для применения ЭСК в клинической практике [1]. К настоящему времени известно о возникновении таких хромосомных аномалий при культивировании ЭСК, как появление в геноме лишних 12, 17 и X хромосом [2–4].

В декабре 2008 года в журнале *Nature Biotechnology* появилось сразу две работы независимых групп исследователей, где было показано, что набор хромосомных aberrаций, происходящих в ЭСК человека при культивировании, несколько шире уже известного. При этом исследователи не стали ограничиваться общепринятой окраской препаратов метафазных пластинок по Гимзе, применяющейся для учета хромосомных aberrаций, поскольку этот метод не обладает достаточной точностью. Помимо стандартного метода был использован анализ единичных нуклеотидных полиморфизмов (т.н. SNP-анализ от single nucleotide polymorphisms), основанный на микрочиповой технологии [3], и проведена сравнительная геномная гибридизация, также результаты были подтверждены флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) и оценено влияние хромосомных aberrаций на экспрессию генома с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR).

Научная группа C. Spits охарактеризовала семнадцать линий ЭСК человека, полученных в собственной

лаборатории по известной методике [5] и культивированных различное число пассажей. Наименьшее число пассажей, на котором был произведен анализ — 5, наибольшее — 276. По какой причине авторы построили свой эксперимент именно таким образом, в работе не указано, хотя, казалось бы, гораздо логичнее было проводить анализ кариотипа и генома клеточных линий на определенных пассажах.

В культивировавшихся линиях было выявлено три типа хромосомных аномалий: трисомии либо моносомии по хромосомам 22, 18 и 17 (только в одной линии); субмикроскопические дупликации (дупликации участков хромосом, не выявляемые окраской по Гимзе); появление в клетках гибридной хромосомы, включающей короткое плечо хромосомы 18, ее центромерный участок и длинное плечо хромосомы 5 либо 7.

Наиболее часто среди встретившихся субмикроскопических дупликаций, выявившихся в пяти линиях ЭСК после длительного культивирования (более чем 100 пассажей), была дупликация локуса 20q11.21. Эта аномалия уже была описана прежде для двух линий ЭСК — H7 и HSF1, однако ей не придавали большого значения, считая характерной только для конкретных клеточных линий [3, 6]. Группа C. Spits показала, что данная мутация имеет в разных случаях разную протяженность и может затрагивать ген *dnmt3b*, продукт которого участвует в пролиферации клеток и защищает ЭСК от апоптоза. Увеличение количества белка DNMT3B в клетках с произошедшей дупликацией приводило к тому, что клетки начинали активнее пролиферировать, а также были в меньшей степени склонны к спонтанной дифференцировке, обычно наблюдающейся по краям колоний ЭСК. Другими генами, которые могли подвергаться дупликации, были известный регулятор самообновления ЭСК *sox-2* и протоонкоген *c-myc*.

Исследователи под руководством A.L. Perrier (работы N. Lefort), статья которых была опубликована одновременно со статьей C. Spits и соавт., сосредоточились на изучении дупликации локуса 20q11.21, включающей до 23 генов и микро-РНК *hsa-miR-1825*, проанализировав пять линий ЭСК человека. При этом кариотип клеток оценивался на каждом пассаже до пассажа, на котором впервые определялась данная аномалия. Для линий ЭСК, выбранных французскими учеными, ранее был показан нормальный диплоидный кариотип (по данным регистра эмбриональных стволовых клеток NIH [7]). Дупликации были обнаружены в четырех линиях из пяти на пассажах от 50 до 105. То, что в одной линии аномалия так и не выявилась, исключает влияние на появление дупликации условий культивирования, принятых в данной лаборатории. В остальных четырех линиях ЭСК дупликации были обнаружены на соответствующих пассажах

в от 24% до 57% клеток. При этом клетки с дупликацией, как подчеркивают авторы работы, не отличались от нормальных скоростью пролиферации и экспрессией характерных для ЭСК маркерных генов.

Известно, что амплификация локуса 20q11.21 наблюдается при карциномах молочной железы [8], раке легкого [9], гепатоцеллюлярной карциноме [10], раке мочевого пузыря [11], на ранних стадиях рака шейки матки [12], а также при меланоме [13]. По-видимому, эта область генома содержит гены, регулирующие пролиферацию клеток, хотя группа N. Lefort и не обнаружила в ЭСК с ее дупликацией повышения пролиферативной активности. Также следует обратить особое внимание на содержащуюся в регионе 20q11.21 микро-РНК, поскольку в настоящее время известно, что микро-РНК являются ключевыми регуляторами активности жизненно важных генов и задействованы в канцерогенезе [14].

Ученые из научной группы C. Spits предположили, что появление описанных субмикроскопических дупликаций, а также фрагмента хромосомы 18, соединенного с фрагментом 5 либо 7 хромосомы, обусловлено нарушением механизмов репарации ДНК. В хромосоме 18 часто возникает двунитевой разрыв в определенной области (т. н. fragile site, участок разрыва) и происходит потеря длинного плеча вместе с теломерным участком. Затем потерянный участок хромосомы восстанавливается, однако в качестве основы по какой-то причине используются хромосомы 5 либо 7 [15]. Такие нарушения, как было недавно показано, могут быть индуцированы определенными условиями культивирования, например заменой фетальной бычьей сыворотки на искусственные аналоги сыворотки [16]. Причина, по-видимому, кроется в том, что в искусственной сыворотке отсутствуют некоторые необходимые рибонуклеотиды, что приводит к нарушениям механизмов репарации ДНК. Относительно субмикроскопических дупликаций авторы свое предположение никак не поясняют.

Таким образом, впервые было показано, что помимо уже описанных изменений кариотипа для ЭСК человека характерно возникновение хромосомных аномалий, затрагивающих одновременно хромосомы 18, 5 и 7, а также дупликации области 20q11.21, включающей гены, продукты которых участвуют в регуляции самообновления и дифференцировки ЭСК. Эти данные указывают на необходимость более тщательного контроля характеристик ЭСК в культурах и применения более чувствительных методов, нежели использующиеся сегодня. В то же время полученные результаты — исключительно феноменологические и не дают ответов на вопросы о причинах и механизмах возникновения хромосомных аберраций в ЭСК, которые, несомненно, требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Josephson R. Molecular cytogenetics: making it safe for human embryonic stem cells to enter the clinic. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2007; 7(4): 395–406.
2. Baker D.E., Harrison N.J., Maltby E. et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25(2): 207–15.
3. Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N. et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetics* 2005; 37: 1099–103.
4. Josephson R., Sykes G., Liu Y. et al. A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines. *BMC Biology* 2006; 4: 28.
5. Mateizel I., De Temmerman N., Ullmann U. et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Human Reproduction* 2006; 21: 503–11.

6. Wua H., Kima K.J., Mehtac K. et al. Copy Number Variant Analysis of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2008; 26(6): 1484–89.
7. <http://stemcells.nih.gov/research/registry>
8. Tanner M.M., Tirkkonen M., Kallioniemi A. et al. Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res.* 1996; 56(15): 3441–5.
9. Tonon G., Wong K.K., Maulik G. et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *PNAS* 2005; 102(27): 9625–30.
10. Midorikawa Y., Yamamoto S., Ishikawa S. et al. Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene* 2006; 25(40): 5581–90.
11. Hurst C.D., Fiegler H., Carr P. et al. High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2004; 23(12): 2250–63.



12. Scotto L., Narayan G., Nandula S.V. et al. Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47(9): 755–65.

13. Koynova D.K., Jordanova E.S., Milev A.D. et al. Gene-specific fluorescence in-situ hybridization analysis on tissue microarray to refine the region of chromosome 20q amplification in melanoma. *Melanoma Res.* 2007; 17(1): 37–41.

14. Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *PNAS* 2004; 101(9): 2999–3004.

15. Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 2000; 15(4): 289–302.

16. Lukusa T., Fryns J.P. Human chromosome fragility. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1779(1): 3–16.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Spits C., Mateizel I., Geens M. et al. Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2008; 26(12): 1361–3. Lefort N., Feyeux M., Bas C. et al. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nature Biotechnology* 2008; 26(12): 1364–6

Ниша гемопоэтических стволовых клеток *in vivo*: «увидеть своими глазами»

Функциональное состояние гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) регулируется совокупностью внешних сигналов от специфического микроокружения, называемого «нишей» стволовых клеток [1]. Полагают, что терапевтические манипуляции на уровне ниши ГСК могли бы стать весомой альтернативой трансплантационным подходам в клинике. Однако до сих пор нет единого мнения о том, какова молекулярная природа регуляторных сигналов в нише и какие клетки отвечают за их продукцию. В последние годы был обнаружен ряд молекул (ангиопоэтин, тромбопоэтин, хемокин CXCL12, остеопонтин и др.), нарушение экспрессии которых существенно сказывается на взаимодействии ГСК со своей микросредой. Иммуногистохимические исследования, в свою очередь, показали, что ГСК локализуются вблизи эндоста — гетерогенного слоя клеток, выстилающего костномозговую полость (так наз. «эндостальная» ниша ГСК). Эндостальная выстилка образована остеобластами, остеогенными клетками-предшественниками (часто обозначаемыми как «клетки костной выстилки» — bone-lining cells) и остеокластами; при этом остеобласты рассматриваются как главный клеточный компонент эндоста, отвечающий за регуляцию ГСК [2, 3].

В дополнение, исследовательская группа S.J. Morrison обнаружила в образцах костного мозга и селезенки мышей устойчивые ассоциации CD150⁺ ГСК с эндотелием сосудов, что указало на возможное существование еще одной, «сосудистой» ниши ГСК [4]. Действительно, через сосудистый эндотелий поступают эндокринные сигналы от циркулирующих гормонов, цитокинов и факторов роста, поэтому контакт стволовых клеток с эндотелием позволяет ускорить их функциональный ответ на внешний стимул. Например, как уже обсуждалось [5], нейральные стволовые клетки своими отростками тесно контактируют с эндотелием сосудов в специфических зонах, где повышена проницаемость гематоэнцефалического барьера. Более того, взаимодействие ГСК с клетками сосудов представляется особо важным в очагах экстремедуллярного гемопоэза (печень, селезенка), где нет костной ткани [1].

С другой стороны, разделение микроокружения ГСК на «эндостальную» и «сосудистую» нишу весьма условно по следующим причинам [1]. Во-первых, эндост

характеризуется высокой степенью васкуляризации и поэтому ГСК, взаимодействующие с эндостом, так или иначе, оказываются в непосредственной близости от сосудов. Во-вторых, контакт ГСК с окружающими клетками может служить для их закрепления в костном мозге, и регуляция функциональной активности ГСК тогда осуществляется за счет продукции растворимых факторов. В этом случае локализация ГСК в костном мозге утрачивает свое первостепенное значение. В-третьих, данные анализа фиксированных иммуногистохимических препаратов не позволяют отличить устойчивые, функционально значимые ассоциации ГСК с окружающими клетками от кратковременных и случайных и поэтому не могут в полной мере отразить естественное распределение ГСК *in vivo*. Таким образом, информация, полученная путем текущего наблюдения за стволовыми клетками в их естественном окружении, позволила бы ответить на вопрос о действительном распределении ГСК в костном мозге и о том, где на самом деле происходит их самообновление.

В декабре на сайте журнала *Nature* появились две публикации, посвященные структуре и формированию ниши ГСК во взрослом организме мышей. Так, Y. Xie с соавт. (совместное исследование групп Ricardo A. Feldman и Linheng Li) и C. Lo Celso с соавт. (группа D.T. Scadden) удалось в реальном времени проследить за стволовыми трансплантированными ГСК в костном мозге животных.

Отсутствие уникального маркера создает существенное препятствие для визуализации живых ГСК *in vivo* или *ex vivo*. Действительно, в случае изучения стволовых клеток с комплексным фенотипом не подходят трансгенные животные, несущие ген-репортер под контролем промотора специфического маркерного гена. Поэтому одним из решений может быть трансплантация предварительно обогащенной и отсортированной популяции меченых клеток. Y. Xie с соавт. выделяли популяцию клеток с фенотипом Flk2⁺/Lin[−]/Sca-1⁺/c-Kit⁺ (Flk2⁺ LSK) у трансгенных мышей с GFP-репортером, контролируемым промотором повсеместно экспрессируемого гена актина. C. Lo Celso с соавт. использовали в работе ГСК с различными, частично перекрывающимися фенотипами (LSK CD34[−]/Flk2[−], LSK CD150⁺/CD48[−], LSK Flk2[−]/CD48[−]), при этом сортированные клеточки

окрашивали липофильными цианиновыми красителями (Vybrant DiD и DiI). Для визуализации костной ткани авторы применяли SHG-микроскопию (коллаген способен генерировать SHG-сигнал); остеобласты выявляли по экспрессии GFP у трансгенных Col2.3-GFP мышей (коллаген Ia является маркером остеобластов); для микроскопии сосудов использовали «квантовые точки» (Qdot 655 и 800), которые вводили мышам в ретроорбитальный синус непосредственно перед анализом.

Для наблюдения за взаимодействием ГСК с компонентами ниши Y. Xie с соавт. разработали уникальный метод визуализации стволовых клеток *ex vivo* (*ex vivo* imaging stem cells, EVISC). EVISC предполагает наблюдение за мечеными ГСК в костном мозге с помощью чувствительной двухфотонной микроскопии после их трансплантации экспериментальным животным. Для этого толстые (2–3 мм) срезы бедренной или большеберцовой костей помещали в культуральную чашку с полуплотной средой, после чего проводили детекцию клеток в реальном времени на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе. Исследовательская группа D.T. Scadden пошла дальше, решив изучить распределение меченых ГСК в костном мозге живых животных. Для этого авторы использовали свою модификацию метода интравитальной конфокальной микроскопии, с помощью которой изучали ГСК в костях свода черепа [6]. Таким образом, предложенные авторами подходы позволили наблюдать в реальном времени за миграцией, распределением и пролиферацией трансплантированных ГСК в костном мозге мышей, а также изучать взаимодействие этих клеток с микроокружением.

Прежде всего, Y. Xie с соавт. подтвердили, что трансплантированные ГСК мигрируют преимущественно в костный мозг, но не заселяют другие органы (например, печень и селезенку), для чего проследили за распределением Scl-экспрессирующих клеток с помощью биолюминесцентного мечения *in vivo*.

Далее, Y. Xie с коллегами обнаружили, что эндостальная поверхность костной ткани в большей степени покрыта сосудистой сетью (CD31⁺), нежели остеобластоподобными клетками (N-кадгерин⁺). При этом, как и предполагалось, сосуды локализованы рядом с остеобластами, что не позволяет четко разделить «эндостальную» и «сосудистую» ниши ГСК. Для маркирования остеобластов авторы использовали антитела к двум маркерам — N-кадгерину и транскрипционному фактору Osterix (Osx), — а также трансгенных Col2.3-GFP мышей. Оказалось, что N-кадгерин экспрессировался как Osx⁺, так и Osx⁻ клетками, причем N-кадгерин⁺ клетки были локализованы рядом с Osx⁺ остеобластами. Авторы полагают, что N-кадгерин⁺ клетки, по всей видимости, представляют собой дифференцирующиеся остеогенные клетки, поскольку N-кадгерин экспрессируется на разных стадиях дифференцировки остеобластов [7], в то время как Osterix в постнатальный период активен в зрелых остеобластах, синтезирующих костный матрикс [8].

Авторы обеих публикаций показали, что ГСК заселяют костный мозг только облученных животных, причем стволовые клетки накапливаются вблизи эндоста. Так, Y. Xie с соавт. сравнивали распределение GFP⁺ ГСК в костном мозге через 5–8 ч после трансплантации облученным и интактным мышам-реципиентам. Повреждение костного мозга в результате облучения способствовало накоплению GFP⁺ ГСК около эндостальной поверхности, а у необлученных мышей трансплантированные клетки скапливались преимущественно в просвете костномоз-

говой полости: у облученных мышей 58,1 % (47 % — у группы D. T. Scadden) меченых клеток располагались в пределах 12–16 мкм от эндоста, у необлученных животных — только 12,5 %. По данным C. Lo Celso с соавт., у необлученных мышей введенные ГСК располагались близко к сосудам (0–16 мкм) и были функционально некомпетентными, о чем свидетельствовали результаты долговременных (4 мес.) трансплантационных тестов. Это подтверждает тот факт, что ГСК не способны к приживлению в необлученном костном мозге. Интересно также отметить, что у облученных мышей GFP⁺ ГСК в основном мигрировали в зону губчатого вещества кости (83,8 %) по сравнению с компактным веществом (16,2 %), чего, однако, не наблюдалось у интактных животных. Выяснилось, что избирательная миграция ГСК связана с повышенной экспрессией хемокина CXCL12 (SDF-1) в губчатом веществе кости после облучения.

С какими же клетками эндоста взаимодействуют трансплантированные ГСК? По данным Y. Xie с соавт., в 10 из 17 случаев (59 %) GFP⁺ ГСК прикреплялись либо находились вблизи эндостальных N-кадгерин⁺ клеток. Важно отметить, что ГСК тоже экспрессировали N-кадгерин, хотя и в значительно меньшем количестве; при этом молекулы N-кадгерина располагались в зоне контакта мембран ГСК и клеток эндоста, что свидетельствует о функциональной значимости такой экспрессии. Схожие результаты были получены авторами и ранее [3]. С другой стороны, роль N-кадгерин-зависимых взаимодействий между ГСК и эндостальными клетками достаточно сомнительна. Например, группа S. Morrison не смогла выявить экспрессию N-кадгерина в ГСК (хотя использовала тот же клон моноклональных антител, что и группа L. Li) [9], а также не обнаружила каких-либо значимых изменений в гомеостазе ГСК и кроветворении у мышей, гемопоэтические клетки которых были дефицитны по гену N-кадгерина [10]. Конечно, нельзя исключить, что ГСК используют другие молекулы адгезии для закрепления в нише.

При трансплантации меченых ГСК облученным животным пролиферирующие GFP⁺ клетки (Ki67-позитивные) обнаруживались вблизи эндоста, при этом число Ki-67⁺/GFP⁺ ГСК у облученных мышей было в пять раз больше, чем у необлученных животных (соответственно 35% и 7%). Кроме окраски маркера пролиферации Ki-67, Y. Xie с коллегами удалось проследить за делениями отдельных GFP⁺ клеток с помощью EVISC. Расчеты показали, что в результате пролиферации в организме облученных животных трансплантированные GFP⁺ ГСК увеличивают свое количество более чем в 6 раз за 2 нед. (от 2000 до ~13 000 клеток), причем более активная пролиферация отмечается в губчатом веществе кости. Аналогично, C. Lo Celso с соавт. наблюдали за пролиферацией DiD⁺ клеток *in vivo*: меченые ГСК образовывали кластеры из нескольких клеток, причем интенсивность флуоресцентного сигнала у дочерних клеток была снижена как результат распределения мембранотропной метки; кроме того, ГСК накапливали 5-бромдезоксимуридин (BrdU). Таким образом, трансплантированные ГСК способны активно пролиферировать *in vivo* в ответ на повреждение.

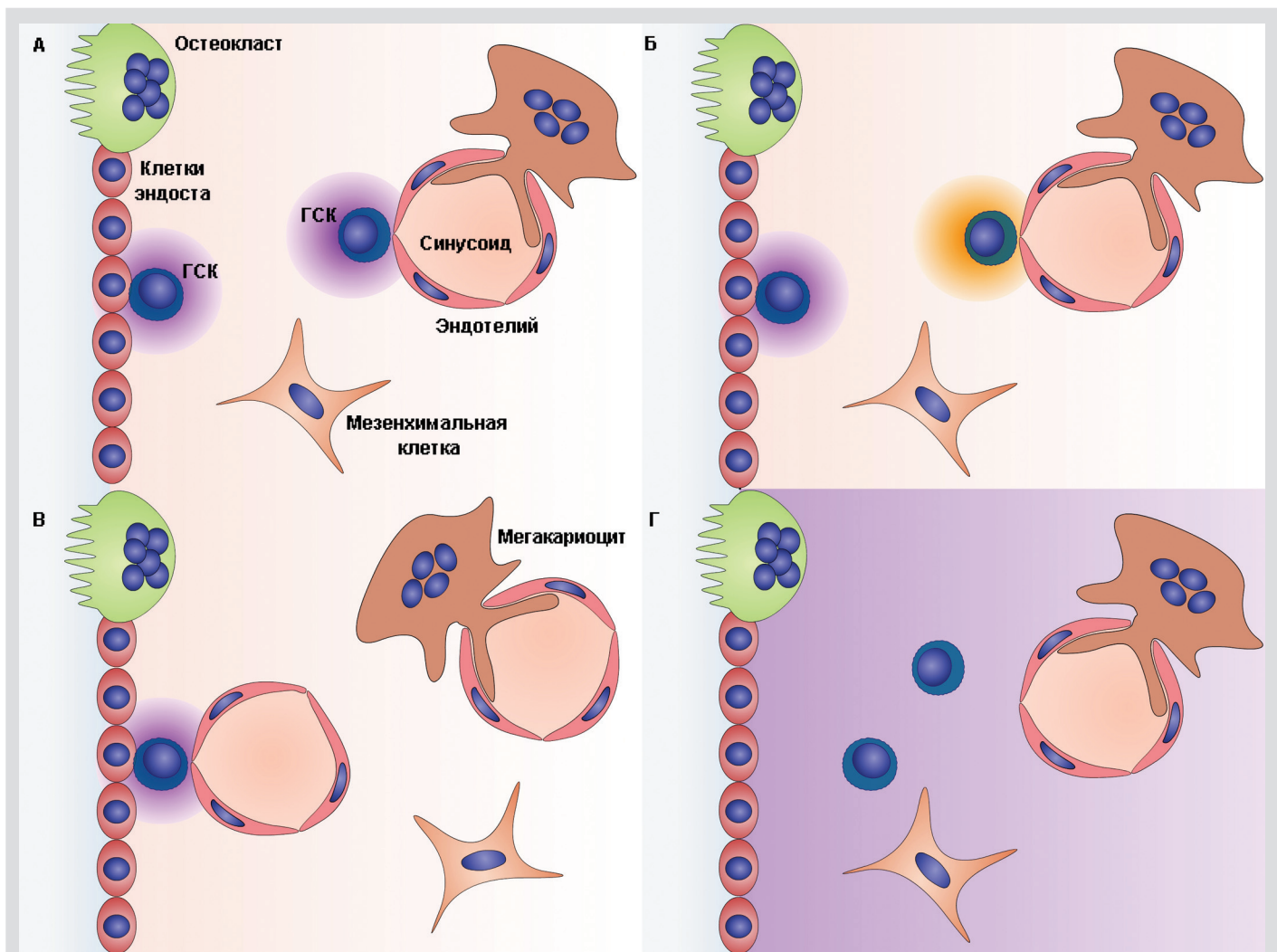
В заключение, группа D.T. Scadden обнаружила, что расположение ГСК по отношению к эндосту зависит от функционального состояния как самих клеток, так и их микроокружения. Во-первых, положение гемопоэтических клеток относительно костномозгового микроокружения определяется их дифференцировочным статусом. Так, истинные «долгосрочные» ГСК (LSK CD34-/Flk2-), а

также непролиферирующие клетки, располагаются ближе к остеобlastам и эндосту, нежели мультипотентные (LSK CD34⁺/Flk2⁺) или коммитированные (Linlow Sca-1⁺/c-Kit⁺) клетки-предшественники.

Во-вторых, на локализацию ГСК влияет состояние самой ниши. Трансгенные PPR мыши, у которых конститутивно активный ген рецептора к паратиреоидному гормону (ПТГ) и ПТГ-подобному белку (PTH/PTHrP) контролируется промотором остеобlast-специфичного гена Col12.3kb, содержат повышенное количество остеобlastов и ГСК, а также увеличенный объем трабекулярной костной ткани [2]. DiD⁺ ГСК, введенные таким мышам, располагались значительно ближе к эндостальной поверхности по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, изменения локализации ГСК могут быть одним из объяснений противоречивых данных о роли отдельных клеток в формировании ниши. К примеру, у PPR мышей увеличение количества остеобlastов согласует-

ся с повышенным содержанием ГСК [2], в то время как выраженная деплеция остеобlastов у biglycan-дефицитных мышей не отражается на количестве и функциональных свойствах кроветворных клеток [9].

Итак, авторами работ были предложены два мощных и многообещающих подхода для анализа кроветворных стволовых клеток в условиях, наиболее приближенных к естественным. Эти предварительные результаты показали, что пока нет достаточных оснований разделять микроокружение ГСК на отдельные «ниши», поскольку эндостальный и сосудистый компоненты находятся в тесной функциональной и структурной взаимосвязи (рис.). Скорее, имеет место «эндостально-сосудистая» ниша ГСК, объединяющая сигналы от разных клеток костного мозга [1]. Кроме того, недостаточно изучено влияние остальных костномозговых клеток (остеокластов, мегакариоцитов, ретикулярных клеток стромы и др.) на гомеостаз ГСК.



Предполагаемые варианты организации «эндостальной» и «сосудистой» ниши ГСК: А — ниши имеют различную локализацию, но функционально сходны; Б — ниши имеют различную локализацию и функцию; В — единая ниша, образованная эндостальными и периваскулярными клетками; Г — «диффузная» ниша: ГСК регулируются паракринными сигналами от костномозговых клеток разных типов. По рисунку M. Kiel и S. Morrison с изменениями [1]

Комплексная структура ниши ГСК была особенно хорошо продемонстрирована в декабрьской публикации группы знаменитого Irving L. Weissman. С. К. F. Chan с соавт. разработали трансплантационный тест, позволивший воссоздать нишу ГСК *in vivo* в неестественном для нее месте — под почечной капсулой. Авторы выделяли клетки из костной ткани 14,5-дневных эмбрионов, еще не заселенной ГСК, и трансплантировали их взрослым мышам под капсулу почки, в результате чего происходила васкуляризация трансплантата и его превращение в гетеротопическую нишу для ГСК реципиента. Колонизация гетеротопической ниши клетками реципиентного животного проходила в следующем порядке. На 16-й день после трансплантации появлялись эритроидные клетки и формировалась сосудистая сеть; на 24-й день выявлялись c-Kit⁺ кроветворные клетки-предшественники; ГСК заселяли трансплантат не раньше 32-го дня.

Было обнаружено, что только CD105⁺/Thy1⁻ клетки образуют костный мозг, заселенный ГСК. CD105⁺/Thy1⁺ клетки дают начало только костной ткани, без костного мозга, а клетки, негативные по обоим маркерам, не формируют ни кости, ни костного мозга. Таким образом, ни остеобласты, ни их предшественники сами по себе не способны обеспечить формирование функциональной ниши ГСК.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kiel M.J., Morrison S.J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(4): 290–301.
2. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425(6960): 841–846.
3. Zhang J., Niu C., Ye L., et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425(6960): 836–841.
4. Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T. et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005; 121(7): 1109–1121.
5. Лелявский А.А. Уникальная микроархитектоника ниши нейтральных стволовых клеток млекопитающих. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2008; 4 (3).
6. Sipkins D.A., Wei X., Wu J.W. et al. In vivo imaging of specialized

Как выяснилось, CD105⁺/Thy1⁻ клетки-предшественники образуют кость по механизму энхондрального остеогенеза, т. е. через стадию хряща, а CD105⁺/Thy1⁺ клетки утратили хондрогенный потенциал и могут дифференцироваться только в остеобласты. Генетическое ингибирование факторов, играющих центральную роль в энхондральном остеогенезе (Osterix) и васкуляризации (VEGF), нарушает формирование в трансплантате костного мозга, пригодного для заселения ГСК. Более того, трансплантация CD105⁺/Thy1⁻ клеток из фетальных костей, формирующихся путем внутримембранного остеогенеза (без этапа замещения хрящевой ткани костной — например, кости свода черепа), также приводит к образованию кости без костного мозга. В дальнейшем предстоит выяснить, каково истинное значение энхондрального остеогенеза в формировании костномозгового микроокружения ГСК и почему ГСК, как показали С. Lo Celso с соавт., всё же заселяют кости свода черепа. Очевидно, что комбинации методических подходов, предложенных исследовательскими группами R.A. Feldman, L. Li, D.T. Scadden и I.L. Weissman, с технологиями направленного мутагенеза помогут ответить на эти и многие другие вопросы касательно тонкой структуры гемопоэтической «ниши».

bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 2005; 435(7044): 969–973.

7. Kawaguchi J., Kii I., Sugiyama Y., Takeshita S., Kudo A. The transition of cadherin expression in osteoblast differentiation from mesenchymal cells: consistent expression of cadherin-11 in osteoblast lineage. *J. Bone Miner. Res.* 2001; 16(2): 260–269.

8. Baek W.Y., Lee M.A., Jung J.W. et al. Positive Regulation of Adult Bone Formation by Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix. *J. Bone Miner. Res.* 2008 Dec 29. PMID: 19113927

9. Kiel M.J., Radice G.L., Morrison S.J. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell* 2007; 1(2): 204–217.

10. Kiel M.J., Acar M., Radice G.L., Morrison S.J. Hematopoietic stem cells do not depend on N-Cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell* 2008 Dec 30.

Подготовил А.А. Лелявский

По материалам: Xie Y., Yin T., Wiegraebe W. et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* 2009; 457(7225): 97–101. Lo Celso C., Fleming H.E., Wu J.W. et al. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 2009; 457(7225): 92–96. Chan C.K., Chen C.C., Luppen C.A. et al. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* 2009; 457: 490–4

Мембранный потенциал играет важную роль в дифференцировке ММСК

Во время эмбрионального развития и регенерации тканей ключевую роль в процессах пролиферации и дифференцировки различных типов стволовых клеток и клеток-предшественниц играет не только молекулярная, но и биофизическая сигнализация, то есть биоэлектрические сигналы, генерируемые при участии ионных каналов, имеющих в клеточной мембране [1, 2]. Например, на модели дифференцировки клеток нейробластомы было продемонстрировано, что дифференцировка сопровождается деполяризацией мембраны, вызываемой работой калиевых и натриевых ионных каналов [3].

На модели заживления раны роговицы также было показано, что колебания мембранного потенциала, создающие в ткани электрические поля, регулируют миграцию клеток [4], их поляризацию и частоту делений [5]. На данный момент, к сожалению, о биоэлектрических сигналах и их роли в развитии и регенерации известно удручающе мало.

Одним из самых интересных направлений в изучении биоэлектрических сигнальных систем является контроль поведения стволовых клеток. Исследования показывают, что стволовые клетки в недифференцированном

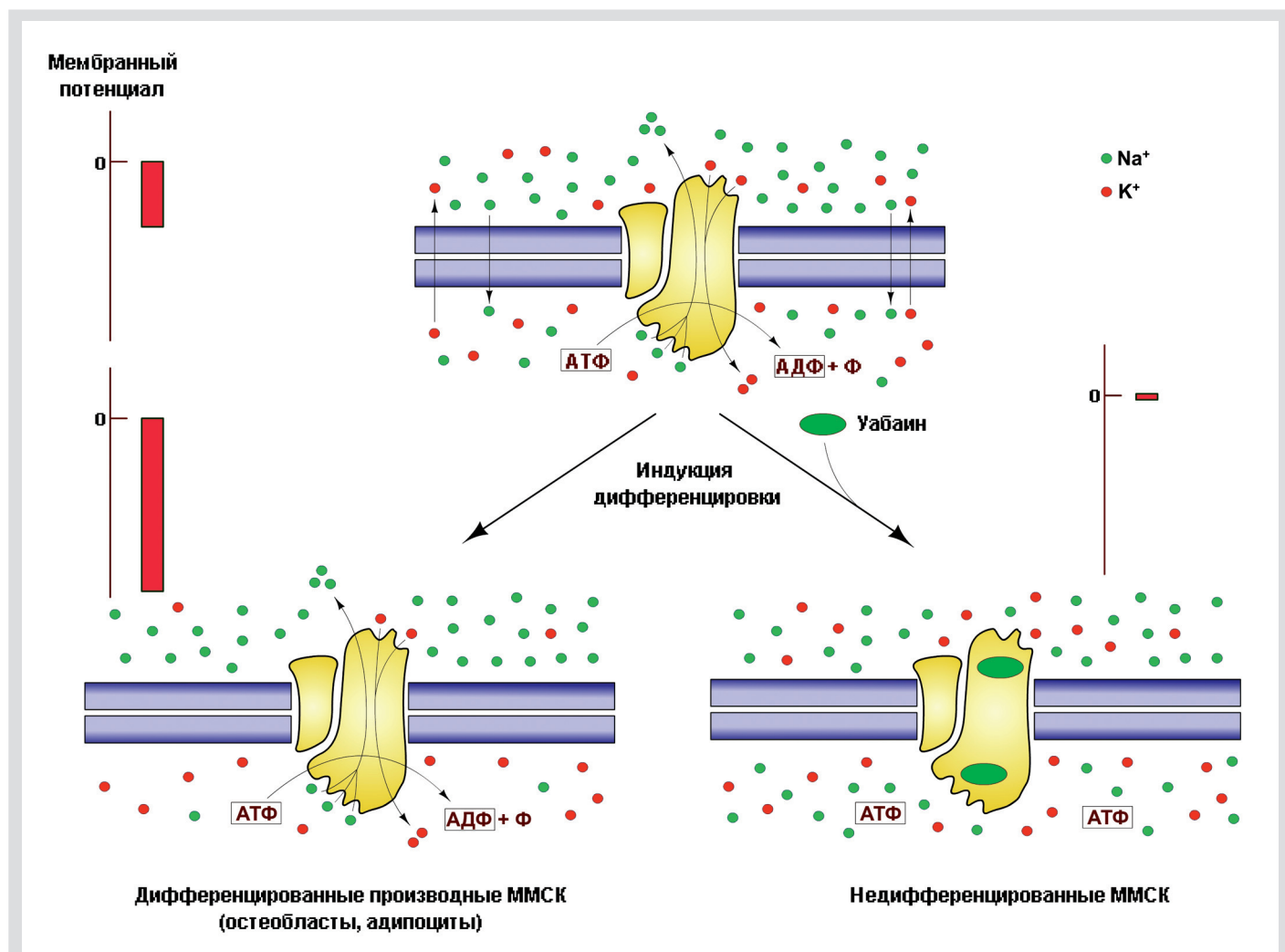
состоянии демонстрируют уникальный профиль электрофизиологических характеристик мембраны [6–10]. Более того, ионные токи имеют огромное значение для дифференцировки миобластов, кардиомиоцитов и нервных клеток [6, 10–13]. Например, при дифференцировке и слиянии миобластов потенциал их мембраны изменяется от -10 до -70 мВ (мембрана становится более отрицательно заряженной, или гиперполяризуется) [14, 15]. Но являются ли эти электрофизиологические сигналы следствием или причиной происходящих в клетках изменений, оставалось до настоящего времени невыясненным. В ноябре 2008 г. была опубликована работа научной группы S. Sundelacruz, в которой ученые охарактеризовали изменения мембранного потенциала (V_{mem}) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга человека при их дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях, а также изучили функциональную взаимосвязь изменений мембранного потенциала и способности клеток к дифференцировке.

Чтобы определить, зависит ли изменение мембранного потенциала ММСК от стадии их дифференцировки, исследователи проследили V_{mem} ММСК в процессе их остеогенной и адипогенной дифференцировки, индуцированной дексаметазоном и индометацином соответственно, с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя DiSBAC2 [16]. Этот краситель представляет собой анионный бис-оксонол, который

встраивается в мембрану при деполяризации клетки. Выяснилось, что флуоресценция по мере дифференцировки ММСК постепенно исчезает, то есть их мембранный потенциал снижается и происходит гиперполяризация мембраны. Причем гиперполяризация происходит постепенно в течение второй, третьей и четвертой недели дифференцировки, достигая максимума к концу четвертой недели после индукции дифференцировки.

Обнаружив зависимость мембранного потенциала от стадии дифференцировки клетки, авторы работы решили проверить, является ли эта гиперполяризация функционально необходимой для дифференцировки. Чтобы это выяснить, они нарушили естественное изменение мембранного потенциала, искусственно деполяризовав мембрану ММСК, в которых уже была запущена дифференцировка. Для этого были применены два разных подхода.

Первый подход заключался в повышении в среде культивирования концентрации ионов калия $[K^+]$. В норме внутриклеточная концентрация калия выше концентрации калия вне клетки, и мембрана остается слабо гиперполяризованной. Когда концентрации ионов по обе стороны от мембраны уравниваются, ее заряд становится равным нулю, то есть мембрана деполяризуется. Вторым, более сложный подход, состоял в блокировании Na^+/K^+ АТФазы, основного генератора трансмембранного потенциала, специфическим ингибитором убаином (рис.).



Влияние величины мембранного потенциала на дифференцировку ММСК *in vitro*

Эффекты деполяризации были оценены по экспрессии характерных для адипогенной и остеогенной дифференцировки генов с помощью метода полимеразной цепной реакции. В случае адипогенной дифференцировки анализировались специфические для адипоцитов транскрипционный фактор PPAR γ [17, 18] и ген специфической липопротеин-липазы (LPL), активируемый транскрипционным фактором PPAR γ . Также колонии клеток были окрашены специфическим для липидных включений красителем Oil Red O. Для оценки остеогенной дифференцировки определялась экспрессия двух специфических генов: щелочной фосфатазы (ALP) и костного сиалопротеина (BSP) [19]. Помимо этого исследователи анализировали активность ALP и внутриклеточную концентрацию ионов кальция.

Оказалось, что деполяризация клеточной мембраны с помощью ионов K⁺ (концентрация в среде культивирования — от 20 до 80 mM) ингибирует адипогенную дифференцировку, о чем свидетельствовали снижение экспрессии обоих маркерных генов и данные специфической гистологической окраски. При этом ингибирование дифференцировки было обратимым — при возвращении в стандартные условия культивирования через три недели ММСК восстанавливали способность отвечать на индометацин. Чтобы убедиться, что подавление дифференцировки не специфично для ионов K⁺, а действительно является следствием деполяризации, исследователи подтвердили свои результаты, оценив адипогенную дифференцировку ММСК при ингибировании Na⁺/K⁺ АТФазы. Эффект оказался таким же, хотя блокирование Na⁺/K⁺ мембранной помпы в несколько меньшей степени снижало экспрессию маркерных генов, нежели повышение концентрации калия во внешней среде. Возможно, в клетках просто существуют другие механизмы поддержания мембранного потенциала помимо Na⁺/K⁺ АТФазы. При этом подавление дифференцировки, как было показано в отдельной серии экспериментов, оказалось дозозависимым и коррелировало с продолжительностью присутствия деполяризующего агента в среде культивирования.

Сходным образом деполяризация с помощью ионов калия или убаина ингибировала остеогенную дифференцировку ММСК. Наблюдалось снижение уровня экспрессии LPL и BSP, снижение активности щелочной фосфатазы и концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток. Были показаны те же, что и в случае адипогенной дифференцировки, корреляции, то есть снижение способности клеток отвечать на дифференцировочный стимул было тем больше, чем выше была концентрация и продолжительность воздействия деполяризующего агента. Интересный момент: после удаления деполяризующего агента из среды культивирования, V_{mem} возвращался к исходному уровню, а экспрессия маркерных генов не восстанавливалась.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Levin M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends in Cell Biology* 2007; 17: 261–70.
2. McCaig C.D., Rajnicek A.M., Song B., Zhao M. Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential. *Physiological Reviews* 2005; 85: 943–78.
3. Arcangeli A., Rosati B., Crociani O. et al. Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: Potentiating effects of BDNF. *Journal of Neurobiology* 1999; 40: 214–25.
4. Zhao M., Song B., Pu J. et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-c and PTEN. *Nature* 2006; 442: 457–60.
5. Song B., Zhao M., Forrester J.V., McCaig C.D. Electrical cues

regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo. *PNAS* 2002; 99: 13577–82.

Деполяризация ингибировала дифференцировку ММСК в двух направлениях, однако этого результата было недостаточно для полного представления о мембранном потенциале как о ключевом специфическом регуляторе дифференцировки. Поэтому исследователи провели дополнительную серию опытов, чтобы выяснить, насколько влияет на способность к дифференцировке противоположное деполяризации состояние — гиперполяризация.

ММСК, дифференцирующиеся в остеогенном направлении, подвергли воздействию веществ, активирующих калиевые АТФ-зависимые каналы: пинацидила и диазоксиды. Эти вещества, как было показано в нескольких работах, приводят к гиперполяризации мембран клеток различных типов [20–23]. Через семь суток после воздействия гиперполяризующих агентов была оценена экспрессия маркерных генов остеогенной дифференцировки. Действительно, оказалось, что экспрессия этих генов повышается: пинацидил резко повышал экспрессию костного сиалопротеина (примерно в 2 раза) и практически не влиял на экспрессию гена щелочной фосфатазы. Диазоксид повышал экспрессию обоих генов в 2–4 раза. Эффект обоих гиперполяризующих агентов, как и в случае деполяризующих, был дозозависимый — с увеличением концентраций агентов повышалась и экспрессия маркерных генов, достигая своего максимума при V_{mem} = 10 mV.

Было бы интересно выяснить, насколько искусственное изменение мембранного потенциала ММСК может влиять на их дифференцировку в других направлениях, помимо адипогенного и остеогенного, хотя уже на данный момент влияние деполяризации и гиперполяризации на дифференцировку очевидно. Работа группы S. Sundelacruz убедительно доказывает, что изменение мембранного потенциала в сторону гиперполяризации предшествует дифференцировке клеток, и что посредством него можно увеличивать эффективность дифференцировки ММСК под действием индукторов дифференцировки. Деполяризованное состояние мембраны определяет недифференцированное состояние клеток.

В настоящее время уже существует ряд предположений относительно механизмов того, каким образом уровень V_{mem} контролирует внутриклеточные пути сигнализации посредством системы вторичных посредников [1]. В настоящее время авторы работы занимаются изучением влияния на дифференцировку клеток баланса внутриклеточной и внеклеточной концентраций ионов кальция, а также других механизмов изменения мембранного потенциала. Они убеждены, что в будущем методы контроля V_{mem} войдут в повседневную лабораторную и клиническую практику, и будут широко использоваться для стимуляции дифференцировки различных типов стволовых клеток в заданном направлении.

regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo. *PNAS* 2002; 99: 13577–82.

6. Biagiotti T., D'Amico M., Marzi I. et al. Cell renewing in neuroblastoma: Electrophysiological and immunocytochemical characterization of stem cells and derivatives. *Stem Cells* 2006; 24: 443–453.

7. Cai J., Cheng A., Luo Y. et al. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *Journal of Neurochemistry* 2004; 88: 212–26.
8. Gersdorff Korsgaard M.P., Christophersen P., Ahring P.K., Olesen S.P. Identification of a novel voltage-gated Na⁺ channel rNav1.5a in the rat hippocampal progenitor stem cell line HiB5. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2001; 443: 18–30.

9. Heubach J.F., Graf E.M., Leutheuser J. et al. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Journal of Physiology* 2004; 554: 659–72.

10. Van Kempen M.J.A., Van Ginneken A., De Grijs I. et al. Expression of the electrophysiological system during murine embryonic stem cell cardiac differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2003; 13: 263–70.
11. Cho T., Bae J.H., Choi H.B. et al. Human neural stem cells: Electrophysiological properties of voltage-gated ion channels. *NeuroReport* 2002; 13: 1447–52.
12. König S., Hinard V., Arnaudeau S. et al. Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 28187–96.
13. Sun W., Buzanska L., Domanska-Janik K. et al. Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2005; 23: 931–45.
14. Fischer-Lougheed J., Liu J.H., Espinos E. et al. Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir2.1 channels. *Journal of Cell Biology* 2001; 153: 677–85.
15. Liu J.H., Bijlenga P., Fischer-Lougheed J. et al. Role of an inward rectifier K⁺ current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *Journal of Physiology* 1998; 510: 467–76.
16. Altizer A.M., Moriarty L.J., Bell S.M. et al. Endogenous electric

current is associated with normal development of the vertebrate limb. *Developmental Dynamics* 2001; 221: 391–401.

17. Avram M.M., Avram A.S., James W.D. Subcutaneous fat in normal and diseased states. 3. Adipogenesis: From stem cell to fat cell. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2007; 56: 472–92.

18. Spiegelman B.M. PPAR- γ : Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998; 47: 507–14.

19. Zur Nieden N.I., Kempka G., Ahr H.J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 2003; 71: 18–27.

20. Hoenicke E.M., Damiano Jr R.J. Superior 12-hour heart preservation with pinacidil hyperpolarizing solution compared to University of Wisconsin solution. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2001; 20: 1106–14.

21. Lawson K. Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney International* 2000; 57: 838–45.

22. Nielsen-Kudsk J.E. Potassium channel modulation: A new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. *Studies on isolated airways and arteries. Danish Medical Bulletin* 1996; 43: 429–47.

23. Xiong Y., Harmon C.S. Evidence that diazoxide promotes calcium influx in mouse keratinocyte cultures by membrane hyperpolarization. *Skin Pharmacology* 1995; 8: 309–18.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D.L. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Plos One* 2008; 3

Идентификация истинно стволовых клеток скелетной мышечной ткани в популяции миосателлитоцитов

В результате эмбрионального миогистогенеза из стволовых клеток миотома сегментированной мезодермы путем дивергентной дифференцировки развиваются два взаимодействующих между собой дифферона: камбиальный и симпластический, которые формируются параллельно и определяют в постнатальном периоде репаративные свойства [1, 2]. Первый дифферон представлен миосателлитоцитами, впервые описанными А. Мауго (1961), развивающимися из промиоцитов, локализуется между базальной пластинкой и сарколеммой мышечных волокон и является морфофункциональной основой камбиального резерва тканевой системы скелетной мышцы. В постнатальном периоде активная пролиферация миосателлитоцитов определяется уже к третьему дню после повреждения ткани. После серии митозов в посттравматическом рабдомиогенезе из них формируется популяция миобластов, которые, сливаясь, образуют новые мышечные симпласты [1–3]. Симпластический дифферон также участвует в репаративной регенерации: вблизи линии разрыва волокна делятся, ядра, симпласты колбообразно утолщаются с формированием «мышечных почек», растущих по направлению друг к другу с тенденцией к слиянию [4]. Однако вопрос о механизмах репаративной регенерации мышечных симпластов до настоящего времени остается дискуссионным. Это связано с появлением данных о возможности реализации репаративного процесса за счет клеток, образующихся посредством отделения ядросо-державшей части симпластов. Значительную сложность представляет собой доказательство этого механизма, так как с момента отделения «ядерно-саркоплазматической территории» (если этот процесс реален), она становится неотличима по ультраструктуре от миосателлитоцита [2].

Несмотря на наличие ряда механизмов репаративной регенерации скелетной мышечной ткани, гистотипическое восстановление целостности мышц после значительных повреждений ограничено — место дефекта заполняется соединительной тканью [4]. В этой связи достаточно перспективным является изучение механизмов стимуляции репаративной регенерации скелетной мышечной ткани [2], особенно в части, касающейся миосателлитоцитов.

Большинство исследователей отмечают, что популяция миосателлитоцитов гетерогенна, однако нет общепринятого унифицированного разделения на субпопуляции: каждая исследовательская группа предлагает свой вариант в соответствии с поставленными целями и примененными методами. В частности, замечено, что миосателлитоциты различаются по экспрессии CD34 и Myf5 с присутствием немногочисленной фракции, представители которой не экспрессируют ни один из них [5]. Ряд авторов предполагают, что именно эта группа составляет популяцию стволовых клеток, в то время как оставшаяся большая часть — коммитированные в миогенном направлении клетки [6, 7]. По другим данным, экспрессия Myf5 отражает лишь степень активности, а не детерминацию дифференцировки, за которую ответственен MyoD [8].

Одной из важнейших характеристик стволовых клеток является способность к самообновлению *in vivo* — долгосрочной пролиферации без сопутствующей дифференцировки [9]. Поэтому для обоснованного определения одной из субпопуляций миосателлитоцитов как миогенных стволовых клеток большинство исследователей пытаются установить способность их к многократному делению, используя, главным образом, метод серийных трансплантаций [10, 11], который, однако, не обладает достаточной чувствительностью и не позволяет в полной

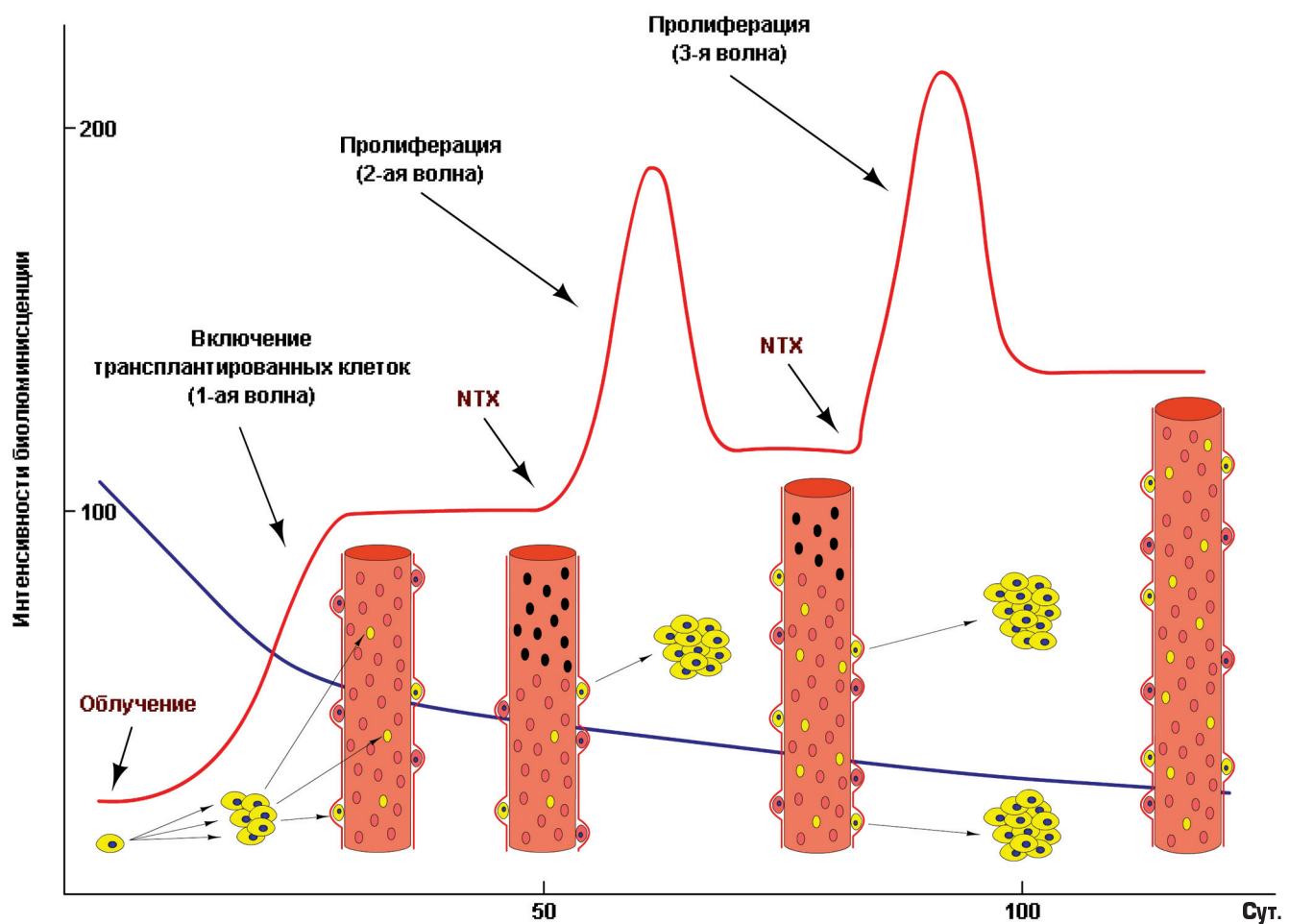
мере оценить экспансию непосредственно в организме лабораторного животного, а также произвести прижизненное изучение динамики пролиферации клеток в ответ на стимуляцию. В этой связи, особый интерес представляет работа А. Sacco с соавт. (2008), демонстрирующая способность части сателлитоцитов к долгосрочной пролиферации *in vivo* с использованием высокочувствительного биолюминесцентного метода.

Исследователи использовали трансгенных мышей в качестве доноров $CD34^+/integrin-\alpha 7^+/Pax7^+/Myf5^+$ сателлитных клеток, в которых Myf5 был сцеплен с геном светлячковой люциферазы (firefly luciferase, FLuc) — индуктором биолюминесцентного сигнала. Около четверти полученных сателлитоцитов не экспрессировали MyoD, что свидетельствовало о гетерогенности клеточной популяции. Линейность, чувствительность и воспроизводимость биолюминесцентного сигнала для определения численности клеток были подтверждены *in vitro*, где минимальное количество клеток, выявляющихся с помощью определения метки, было равно десяти.

При трансплантации 5000 меченых миосателлитоцитов в область передней большеберцовой мышцы, предположительно лишенной нативных прогениторов местным облучением в дозе 18 Гр, через 4 нед. наблюдалось шестидесятикратное усиление биолюминесценции,

соответствующей сигналу от 3×10^5 клеток. Гистологически определялись образованные за счет введенных миосателлитоцитов мышечные симпласты. В контроле, при трансплантации даже большего количества (20000) постнатальных миобластов к тому же сроку наблюдалось значительное ослабление свечения, что свидетельствует о снижении численности введенных клеток, признаки рабдомиогенеза не выявлялись.

Исследователи также установили, что даже при введении всего 10 миосателлитоцитов в 16% случаев наблюдается значительная экспансия *in vivo*. По мнению авторов, такая доля положительных случаев обусловлена гетерогенностью, выживаемостью клеток после изоляции и трансплантации, а также порогом обнаружения биолюминесценции. С течением времени численность популяции подвергалась стабилизации, скорость наступления которой определялась исходным количеством трансплантированных миосателлитоцитов: чем меньшее количество было введено, тем позже наблюдалась «фаза плато». Выход из периода пролиферативного покоя наблюдался при двукратной травматизации мышцы в виде восьмидесяти- и стократного увеличения численности популяции соответственно. Важно, что окончанием каждой «волны пролиферации» являлось некоторое снижение численности клеток за счет апоптоза



Схематическое представление динамики изменения численности трансплантированных миосателлитоцитов (красная линия) в сравнении с коммитированными миобластами (синяя линия): три волны пролиферации



(установлено иммуногистохимическим методом), что может быть связано с устранением физиологической избыточности функционального ответа на повреждение. При отсутствии повреждений количество клеток достигало максимума к концу второй недели без последующего падения. В контроле численность введенных миобластов снижалась с первых дней после трансплантации.

Пролиферация миосателлитцитов как основа усиления биолюминесцентного сигнала подтверждалась высоким уровнем экспрессии Ki-67, установленным на 7, 13 и 19-е сут. эксперимента.

На последнем этапе исследователи в опытах *in vitro* и *in vivo* показали, что в 4% случаев даже одна клетка способна к долгосрочной пролиферации (около 14–17

делений). Выделенные через два месяца дочерние клетки трансплантированных миосателлитцитов, согласно иммуногистохимическому и генетическому анализу, не отличались от введенных клеток.

Таким образом, авторы с использованием биолюминесцентного метода привели доказательства, позволяющие предположить, что гетерогенная популяция сателлитцитов включает истинно стволовые клетки, способные к долгосрочной пролиферации и дифференцировке в миогенном направлении. Разработка высокоселективных методов их получения может послужить основой для дальнейшего применения в рамках клеточной терапии для лечения пациентов с повреждениями мышечной системы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Данилов Р.К. Источники развития миобластов при регенерации скелетных мышц. Онтогенез, 1983; 14(5): 551–5.
2. Данилов Р.К. Очерки гистологии мышечных тканей. — Уфа: Башкортостан, 1994. — 50с.
3. Клишов А.А. Гистогенез, регенерация и опухолевый рост скелетной мышечной ткани. Л.: Медицина, 1971. — 175 с.
4. Повзун С.А. Общая патологическая анатомия. Учебное пособие для медицинских вузов. — СПб.: СТИС, 2006. — 336 с.
5. Beauchamp J.R., Heslop L., Yu D.S. et al. Expression of CD34 and myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. J. Cell Biol. 2000; 151: 1221–34.
6. Seale P., Asakura A., Rudnick M. A. The Potential of Muscle Stem Cells. Developmental Cell 2001; 1: 333–42.
7. Kuang S., Kuroda K., Le Grand F. et al. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. Cell 2007; 129(5): 999–1010.
8. Sacco A., Doyonnas R., Kraft P. et al. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. Nature 2008; 456(7221): 502–6.
9. Deasy B.M., Gharaibeh B.M., Pollett J.B. et al. Long-Term Self-Renewal of Postnatal Muscle-derived Stem Cells. MBC 2005; 16 (7): 3323–33.
10. Collins C.A. Satellite cell self-renewal. Curr Opin Pharmacol 2006; 6(3): 301–6.
11. Mauro A. Satellite cells of muscle skeletal fibers. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961; 9: 493–5.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Sacco A., Doyonnas R., Kraft P. et al. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. Nature 2008; 456(7221): 502–6

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Первая успешная трансплантация тканеинженерной трахеи в клинике

Выраженные стенозы дыхательных путей, причиной которых являются устойчивые к радио- и химиотерапии опухоли, инфекции или травмы, представляют собой серьезную медицинскую проблему, так как в ряде случаев для них не существует эффективных реконструктивных методов лечения. Для пациентов с этой патологией часто единственным решением является операция бронхэктомии с последующим наложением анастомоза между свободными концами [1]. Однако длина изымаемого участка, как правило, ограничена несколькими сантиметрами и ее увеличение возможно только в случае замещения органа. С другой стороны, все попытки создания аутогенных и синтетических трансплантатов до настоящего времени были неудачными, а использование в клинической практике аллогенных трансплантатов имеет значительные ограничения [1–4].

В доклинических испытаниях с использованием тканеинженерных эквивалентов трахеи и бронхов предлагались слишком длительные и трудоемкие методики, чтобы применять их в рутинных клинических операциях [5], или же использовались искусственные матриксы

[4], которые невозможно представить в качестве альтернативы живой ткани. Группа исследователей Р. Macchiarelli и соавт. в своей работе применяла очищенные от клеток донорские трансплантаты трахеи, заселенные аутогенными эпителиоцитами, полученными из биопсийного материала, а также хондроцитами, дифференцированными из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) реципиента. Доклинические испытания были проведены на мышах и свиньях [3]. *In vitro* удалось создать короткие жизнеспособные тканеинженерные участки трахеи [6], которые при трансплантации в организм животного не вызывали иммунного отторжения [7]. Вдохновленные этими результатами, ученые приступили к разработке биоинженерных трансплантатов трахеи и бронхов, и в ноябре 2008 г. в журнале The Lancet появилось сообщение о первой успешной трансплантации трахеи пациентке со стенозом главного левого бронха.

Тридцатилетняя женщина поступила в клинику с дисфонией и сильным кашлем, вызванным туберкулезной инфильтрацией шейного отдела трахеи и главного левого

бронха. При обследовании обнаружился стеноз бронха на протяжении 3 см. Попытка поместить в левый бронх стент Дюмона не увенчалась успехом и, несмотря на соблюдение всех предусмотренных процедур, развилась вторичная пневмония, вызвавшая непроходящий кашель и накопление экссудата в плевральных полостях. После удаления стента у пациентки появилась тяжелая дыхательная недостаточность. Единственным решением в этом случае являлась тотальная бронхэктомия, однако такая операция характеризуется высоким риском смерти пациентов. По этой причине исследователи предложили полную резекцию левого бронха и части трахеи, и замещение его биоинженерным эквивалентом, изготовленным из человеческой трахеи.

В качестве матрикса будущего трансплантата был взят сегмент трупной трахеи длиной 7 см. Трахея была очищена от окружающей соединительной ткани, после чего было проведено 25 циклов девитализации, чтобы очистить матрикс от клеток донора и антигенов гистосовместимости. Девитализация проводилась с применением 4% деокси-холата натрия и дезоксирибонуклеазы I [6]; весь процесс занял 6 недель. После каждого цикла девитализации авторы проводили гистологическое исследование ткани, иммунофлуоресцентное для выявления количества оставшихся ядродержащих клеток, а также иммуногистохимическое на наличие в ткани антигенов гистосовместимости HLA-ABC, HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ.

Для заселения трансплантата эпителиоцитами и хондроцитами авторы применили биореактор собственной разработки. На медленно вращающийся отрезок трахеи равномерно нанесли суспензию клеток с помощью шприца — как на внешнюю, так и на внутреннюю его поверхность. Затем трансплантат, наполовину погруженный в среду культивирования, на протяжении всего времени пребывания в биореакторе постоянно вращался, чтобы клетки попеременно контактировали со средой и воздухом. Таким образом были смоделированы реальные условия, в которых эпителиоциты находятся в воздухоносных путях. Также биореактор позволил применить разные среды культивирования для хондроцитов и эпителиоцитов.

В биореакторе трансплантат находился 96 час., после чего был использован в операции для замещения удаленного бронха. При операции был полностью удален

главный левый бронх и участок трахеи, к которому он примыкал. Затем трансплантат был шит в образовавшийся промежуток, и некоторое несоответствие диаметров просвета тканеинженерного эквивалента и просвета бронха реципиента было преодолено благодаря эластичности донорской ткани.

На десятые сутки после операции пациентка была выписана из клиники без признаков дыхательной недостаточности и иммунной реакции отторжения трансплантата. Согласно виртуальной трехмерной реконструкции дыхательных путей по данным, полученным с помощью компьютерной томографии, тканеинженерный эквивалент был практически неотличим от собственных бронхов. По данным биопсии, проведенной через 1 мес. после операции, в трансплантированном участке образовалась слизистая оболочка, хотя авторы не поясняют, насколько она соответствовала слизистой оболочке здоровых бронхов. Также наблюдалась его васкуляризация; авторы работы считают, что васкуляризации трансплантата могли способствовать ангиогенные факторы (bFGF, TGFβ) сохранившиеся в бесклеточном матриксе, однако они не определяли наличие этих веществ в пересаживаемом эквиваленте трахеи.

Период наблюдения за пациенткой составил 4 мес., в течение которых ее состояние оставалось стабильно хорошим. Тем не менее, авторы работы указывают, что перед началом масштабных клинических испытаний их метода требуется период наблюдения более 6 мес., чтобы более точно оценить последствия такой операции. В связи с невозможностью отследить судьбу трансплантированных клеток в организме пациентки, врачи не могут сказать, какие именно клетки сформировали слизистую оболочку в трансплантате: трансплантированные эпителиоциты или клетки, мигрировавшие из слизистой оболочки здоровых участков бронха. Поэтому трудно судить и о том, какой трансплантат предпочтительнее — заселенный клетками или просто бесклеточный донорский матрикс, очищенный от антигенов HLA, который был бы гораздо удобнее для рутинного применения в клинике. В будущем, по-видимому, применение таких трансплантатов без или в сочетании с аутогенными клетками станет решением для пациентов, которым показана обширная бронхэктомия.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Grillo H.C. Tracheal replacement: a critical review. *Ann. Thorac. Surg.* 2002; 73: 1995–2004.
2. Macchiarini P., Walles T., Biancosino C., Mertsching H. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004; 128: 638–41.
3. Birchall M., Macchiarini P. Airway transplantation: a debate worth having? *Transplantation* 2008; 85: 1075–80.
4. Sato T., Tao H., Araki M. et al. Replacement of the left main bronchus with a tissue-engineered prosthesis in a canine model. *Ann. Thorac. Surg.*

2008; 86: 422.

5. Macchiarini P. Trachea-guided generation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004; 128: 14–6.

6. Conconi M.T., De Coppi P., Di Liddo R. et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl. Int.* 2005; 18: 727–34.

7. Jungebluth P., Go T., Asnaghi A., Bellini S. Structural and morphological evaluation of a novel enzymatic detergent tissue engineered tracheal tubular matrix. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008; in print.

*Подготовила А.С. Григорян
По материалам: Macchiarini P., Jungebluth P., Go T. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet 2008; 372(9655): 2023–30*

Прямая внутрикостная трансплантация аллогенных клеток пуповинной крови при острых лейкозах — результаты клинического исследования I/II фазы

Высокодозная химиотерапия с последующей аллогенной трансплантацией стволовых кроветворных клеток (СКК) часто является единственным способом радикального лечения значительного количества гематологических заболеваний. Основными источниками СКК для подобных процедур являются пунктаты костного мозга, периферическая кровь после предварительной мобилизации СКК и пуповинная кровь, богатая СКК *per se*. Пуповинная кровь в качестве источника СКК имеет ряд важных преимуществ. Во-первых, успех трансплантации СКК, полученных из пуповинной крови (ПК-СКК), в отношении приживления последних и минимизации частоты и выраженности реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) гораздо менее «требователен» к совпадению донора и реципиента по антигенам HLA. Так, опубликованный в 2007 г. сравнительный мета-анализ не выявил различий в общей двухлетней выживаемости и частоте развития острой РТПХ у пациентов, получавших ПК-СКК и пациентов, получавших СКК костного мозга (КМ-СКК) несмотря на то, что трансплантаты ПК-СКК не совпадали с реципиентами по 1 или 2 антигенам HLA, а трансплантаты КМ-СКК полностью совпадали с реципиентом по всем антигенам HLA (1). Это означает, что шансы найти подходящего донора для пациента, которому показана аллогенная трансплантация СКК, намного повышаются. В то же время, существует определенная «количественная» проблема, затрудняющая использование ПК-СКК, а именно малое абсолютное число СКК в образцах ПК. Поскольку необходимое количество СКК рассчитывается на кг массы пациента, в детской практике подобной проблемы не стоит, однако в случае с взрослыми это приводит к задержкам восстановления кроветворения (в особенности тромбоцитарного роста) и сравнительно частым отторжениям трансплантата. Был предложен ряд способов преодоления этого препятствия, а именно использование для трансплантации двух образцов ПК-СКК от различных доноров (2, 3), совместное введение ПК-СКК и очищенных CD34⁺ клеток от гаплоидентичного донора (4) либо мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (5), а также предварительная экспансия *ex vivo* СКК (6).

Недавно F. Frassoni с соавт. из госпиталя Сан-Мартино в Генуе, опубликовали результаты I/II фаз клинических испытаний внутрикостного введения аллогенных клеток пуповинной крови для лечения острого лейкоза у взрослых. Авторы этого исследования выдвинули гипотезу, согласно которой внутрикостное введение гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови может повысить эффективность трансплантации в отношении восстановления кроветворной функции. Данная гипотеза базируется на ряде преклинических и клинических исследований. Так, стволовые клетки, содержащиеся в костях конечностей, после облучения всего тела с экранированием одной из конечностей от облучения («limb shielding»), успешно заселяют ниши в других частях тела, что предотвращает смерть от недостаточности кроветворения (7). В другой модели,

репопулирование костного мозга после внутрикостного введения СКК оказалось в десять раз эффективнее, нежели при внутривенном введении этих клеток (8, 9). Наконец, по некоторым данным, задержка восстановления кроветворения после трансплантации ПК-СКК может обуславливаться иными факторами, нежели их недостаточное количество, поскольку у детей ПК-СКК значительно эффективнее восстанавливают резервуар гемопоэтических стволовых клеток через год после трансплантации, нежели КМ-СКК (10).

В исследуемую группу были включены взрослые пациенты (медиана возраста — 36 лет, размах — 18–66 лет) с острым лейкозом — острый миелолейкоз у 20 пациентов (7 пациентов в первой полной ремиссии, 4 пациента во второй полной ремиссии, 9 пациентов с рефрактерным заболеванием), острый лимфобластный лейкоз у 12 пациентов (1 пациент в первой полной ремиссии, 6 пациентов во второй полной ремиссии, 5 пациентов с рефрактерным заболеванием). У 12 пациентов был рецидив после предыдущей аутогенной трансплантации гемопоэтических клеток, и у 2 — после аллогенной трансплантации. Минимальным требованием к трансплантату было совпадение с реципиентом не менее, чем по 4 из 6 антигенов HLA (локусы HLA-A, HLA-B и HLA-DRB1) и наличие не более одного несовпадающего антигена в локусе HLA-DRB1. Кондиционирование пациентов проводили при помощи облучения всего тела в суммарной дозе 12 Гр (26 пациентов, фракционированное облучение дозами по 2 Гр дважды в день на 6, 5 и 4 дни до трансплантации) и циклофосфамида (60 мг/кг в день) во 2 и 1 дни до трансплантации. Четверо пациентов получали тиоптепу (тиофосфамид) на 8 день до трансплантации в дозе 8 мг/кг, треоосульфат в дни 7, 6 и 5 до трансплантации в дозе 10–12 г/м² в день и флударабин в дни 7–3 до трансплантации в дозе 25 мг/м² в день. Два пациента получали менее агрессивный режим кондиционирования, включавший в себя флударабин в дни 6–3 до трансплантации в дозе 40 мг/м² в день, циклофосфамид на 6 день до трансплантации в дозе 50 мг/кг массы тела и однократное облучение всего тела в дозе 2 Гр за день до трансплантации. После кондиционирования стволовые клетки пуповинной крови в количестве $1,4 - 4,2 \times 10^7$ ядросодержащих клеток на кг веса под кратковременной седацией пропופолом вводили моно- (21 пациент) или билатерально (11 пациентов) в верхнюю заднюю ость гребня подвздошной кости. Всем пациентам проводили профилактику реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) при помощи циклоспорина (начиная с 7 дня до трансплантации в стартовой дозе 1 мг/кг в день с постепенным снижением дозы с 90 по 180 день после трансплантации вплоть до отмены), микофенолат мофетила (15 мг/кг дважды в день с 1 по 28 день после трансплантации) и антилимфоцитарного глобулина (3 – 3,75 мг/кг в день на 3 и 2 день до трансплантации). Для повышения эффективности восстановления кроветворения в посттрансплантационном периоде пациенты получали Г-КСФ (21

пациент, 30 МЕд/день) или ПЭГилированный Г-КСФ (6 мг каждые две недели) начиная с 7 дня после трансплантации до восстановления нормальной численности нейтрофилов в посттрансплантационном периоде. Первичными конечными точками исследования являлись восстановление нормальных уровней нейтрофилов и тромбоцитов, вторичными — частота острой РТПХ, рецидивов и общая выживаемость.

В раннем посттрансплантационном периоде (12 дней) в результате полиорганной недостаточности умерло 4 пациента. Один пациент умер через 30 дней после трансплантации, достигнув восстановления нижних уровней нормальных показателей численности нейтрофилов, но до восстановления нормальных значений численности тромбоцитов. У всех остальных пациентов наблюдали полное восстановление кроветворной функции с медианой времени восстановления нормальной численности нейтрофилов и тромбоцитов 23 дня (размах — 14–44) и 36 дней (размах — 16–64) соответственно. Медиана времени до восстановления кроветворной функции статистически значимо не отличалась между группами, получавшими обычный и ПЭГилированный Г-КСФ. Кинетика восстановления численности нейтрофилов и тромбоцитов не отличалась между группами пациентов, получавших моно- и билатеральные инъекции. Приживление трансплантированных клеток и восстановление кроветворения наблюдали даже при введении менее 2×10^7 клеток пуповинной крови на кг веса и несовпадении 2 и даже 3 (у одного пациента) антигенов HLA из 6.

Монолатеральное введение гемопоэтических клеток позволило проследить колонизацию гемопоэтических ниш реципиента при помощи пункции контрлатерального гребня подвздошной кости. Пункции проводились через 30, 90 и 180 дней после трансплантации; уже через 30 дней количество колониеобразующих клеток в контрлатеральных гребнях подвздошной кости статистически значимо не отличалось от такового в месте инъекции, что указывает на быструю рециркуляцию и заселение всего костного мозга донорскими СКК. Начиная с 60 дня после трансплантации, у всех 27 выживших пациентов наблюдался 100% химеризм гемопоэтических клеток периферической крови и костного мозга как в месте инъекции, так и в контрлатеральном сайте.

Всего в ходе испытаний умерло 16 пациентов. Причинами смерти были инфекции (7 пациентов), полиорганная недостаточность (4 пациента) и рецидив лейкоза (4 пациента); 1 пациент умер от EBV-ассоциированного

лимфопролиферативного процесса. На момент окончания наблюдения (медиана — 13 мес., размах — 3–23 мес.) оставшиеся 16 пациентов живы и находятся в ремиссии. Общая однолетняя выживаемость составила 45% (95% ДИ 36–54%). Не было зарегистрировано ни одного случая острой РТПХ 3 или 4 степени. У большей части пациентов не развилась РТПХ (0 степень, 20 пациентов), у двух пациентов наблюдали РТПХ 1 степени и у 4 — РТПХ 2 степени.

В целом, в данном исследовании было продемонстрировано весьма обнадеживающие результаты. Даже в случае введения малого числа клеток ($1,4 \times 10^7$ на кг), а также в случаях несовпадения 2/6 и даже 3/6 антигенов HLA, наблюдали успешное приживление трансплантированных СКК и низкую частоту и выраженность РТПХ. Аналогичные показатели частоты развития РТПХ при внутривенном введении ПК-СКК составляют значительно больше — от 35% до 45%. По мнению авторов, подобный эффект обусловлен комбинацией двух факторов. Во-первых, при внутривенном введении СКК в лимфатические узлы попадает гораздо больше содержащихся в трансплантате Т-клеток, чем при внутрикостном введении, а именно в лимфоузлах происходит презентация антигенов, возникновение и амплификация аллоиммунной реакции. Во-вторых, введенные Т-клетки сразу попадают под иммуносупрессивное действие мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и остеобластов. Эти данные хорошо согласуются со сравнительными экспериментами по внутрикостному и внутривенному введению ПК-СКК на животных моделях (11). Важно также отметить, что традиционная парадигма, согласно которой снижение частоты и выраженности РТПХ сопровождается снижением частоты и выраженности реакции «трансплантат против опухоли» (12), представляющей собой собственно «лечебную» часть аллогенной трансплантации СКК, не действует или по крайней мере действует в гораздо меньшей степени в случае трансплантации ПК-СКК (13), и данное исследование еще раз подтверждает это — на момент окончания исследования с медианой наблюдения 13 месяцев 16 пациентов из 32 живы и находятся в полной ремиссии, при этом из 16 умерших пациентов лишь четверо умерли от рецидива лейкоза. Таким образом, в случае подтверждения полученных данных на больших когортах пациентов в хорошо спланированных клинических исследованиях III/IV фаз, внутрикостное введение может стать решающим шагом к широкому применению ПК-СКК у взрослых пациентов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hwang W.Y., Samuel M., Tan D. et al. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007; 13(4): 444–53.
2. Barker J.N., Weisdorf D.J., DeFor T.E. et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with haematologic malignancy. *Blood* 2005; 105: 1343–47.
3. Brunstein C.G., Barker J.N., Weisdorf D.J. et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with haematologic disease. *Blood* 2007; 110: 3064–70.
4. Magro E., Regidor C., Cabrera R. et al. Early hematopoietic recovery after single unit unrelated cord blood transplantation in adults supported by co-infusion of mobilized stem cells from a third party donor. *Haematologica* 2006; 91: 640–48.
5. Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H. et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical haematopoietic

stem-cell transplantation. *Blood* 2007; 110: 2764–67.

6. Shpall E.J., Quinones R., Giller R. et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2002; 8: 368–76.

7. Van Bekkum D.W., Schotmen E. Protection from haemopoietic death by shielding versus grafting of bone-marrow. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 1974; 25: 361–72.

8. Magrassi L., Castello S., Ciardelli L. et al. Freshly dissociated fetal neural stem/progenitor cells do not turn into blood. *Mol. Cell Neurosci.* 2003; 22: 179–87.

9. Castello S., Podesta M., Menditto V.G. et al. Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp. Haematol.* 2004; 32: 782–87.

10. Frasson F., Podesta M., Maccario R. et al. Cord blood transplantation provides better reconstitution of haematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. *Blood* 2003; 102: 1138.

11. Fukui J., Inaba M., Ueda Y. et al. Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells. *Stem Cells* 2007; 25: 1595–601.



12. Weiden P.L., Fournoy N., Thomas E.D. et al. Antileukaemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med.* 1979; 300: 1068–73.

13. Rocha V., Cornish J., Sievers E.L. et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukaemia. *Blood* 2001; 97: 2962–71.

Подготовил П.В. Белоусов

По материалам: Frassoni F., Gualandi F., Podesta M. et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol.* 2008; 9: 831–39

Успешный клинический опыт применения генной и клеточной терапии тяжелого комбинированного иммунодефицита, вызванного недостатком аденозиндезаминазы

Дефицит фермента аденозиндезаминазы (АДА) в организме человека приводит к развитию тяжелой формы комбинированного иммунодефицита, которому сопутствуют задержки в развитии в постнатальном периоде и постоянно повторяющиеся инфекционные заболевания [1, 2]. Аденозиндезаминаза — фермент из класса каталаз, экспрессирующийся практически во всех клетках организма человека и расщепляющий аденозин на инозин и аммиак. Образующиеся при его отсутствии токсичные продукты метаболизма пуриновых азотистых оснований (дезоксифАТФ) и метилирования (S-аденозил гомоцистеин) приводят к поражению разных тканей и органов, и, прежде всего, органов лимфопоэза, что и приводит к иммунодефициту [1, 3, 4]. Адекватным терапевтическим подходом к лечению данного заболевания является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) HLA-идентичного донора, однако этот вариант может быть реализован лишь для малой части пациентов [5, 6]. Другой метод лечения заключается в применении бычьей аденозиндезаминазы, модифицированной полиэтиленгликолем (ПЭГ-АДА) [2], что улучшает общее состояние пациентов, однако в большинстве случаев не приводит к долговременному восстановлению иммунитета [7, 8]. К тому же, подобная терапия является весьма дорогостоящей и может вызывать появление в организме антител к бычьему ферменту.

Пилотные клинические исследования по применению генной терапии в лечении пациентов с дефицитом АДА не сопровождались возникновением острых лейкозов, которые могут сопутствовать трансфекции клеток ретровирусами [9–11], но пациентам все равно требовались инъекции ПЭГ-АДА, а трансплантированные гемопоэтические клетки, трансфецированные геном *ada*, не были способны полностью восстановить иммунную систему, обеспечивая лишь частичное восстановление лимфопоэза.

В журнале *The New England Journal of Medicine* были опубликованы результаты успешных клинических испытаний генной терапии в лечении тяжелого комбинированного иммунодефицита, вызванного наследственным дефицитом АДА и проведенных в 2000–2006 гг. научной группой A. Aiuti.

В исследование были включены десять пациентов в возрасте от шести месяцев до пяти с половиной лет,

страдавших дефицитом аденозиндезаминазы. За четыре дня до начала генной терапии у всех пациентов был взят костный мозг, из которого методом магнитной селекции клеток (CliniMACS) были выделены CD34⁺ гемопоэтические клетки. Затем клетки культивировали в присутствии цитокинов, стимулирующих гемопоэз (IL-3, тромбопоэтин, KIT-лиганд), и трансфецировали ретровирусным вектором, созданным на основе одного из вирусов лейкемии мышей и содержащим ген аденозиндезаминазы человека [12]. Трансплантации гемопоэтических клеток были проведены после курса бусульфана, не приводящего к гибели гемопоэтических клеток в костном мозге и оказывающего избирательное цитостатическое действие на миелоидные клетки. Впоследствии пациентам регулярно проводили клинические осмотры, а также гематологические, иммунологические и биохимические тесты, в том числе тесты на репликацию ретровируса.

Четырем пациентам из десяти до генной терапии осуществлялась трансплантация костного мозга от частично HLA-совместимых доноров, шести — терапия ПЭГ-АДА, однако это не привело к ремиссии. Всем пациентам были проведены трансплантации трансфецированных геном аденозиндезаминазы аутогенных CD34⁺ ГСК (эффективность трансфекции в среднем составила 28,6% колониеобразующих единиц).

В течение пяти последующих лет восьми из десяти пациентов не требовалась сопутствующая терапия ПЭГ-АДА. Через год после проведения трансплантаций у пациентов были взяты пробы костного мозга и периферической крови. Обнаружилось, что в среднем ретровирусный вектор в костном мозге содержали 5,1% CD34⁺ клеток, 3,5% гранулоцитов (CD15⁺), 8,9% мегакариоцитов (CD61⁺), 3,8% эритроидных клеток (гликофорин А⁺), и 8% В-лимфоцитов (CD19⁺). В периферической крови наблюдалась иная картина: ретровирусный вектор несли 88% Т-клеток, 52,4% В-клеток и 59,2% NK-клеток. Эти цифры были в прямой зависимости от количества трансплантированных трансфецированных клеток. В качестве контроля были использованы образцы костного мозга и периферической крови здоровых доноров.

Повышение активности АДА, которое измеряли с помощью метода капиллярного электрофореза, оценивая

количество активной формы фермента, привело к снижению в клетках лимфоидного ряда концентрации токсичных продуктов метаболизма пуриновых азотистых оснований и восстановлению Т- и В-лимфопоэза. У пяти пациентов количество Т-клеток в периферической крови оказалось даже выше нижней границы нормы, такая же картина наблюдалась для В-лимфоцитов у четырех пациентов. У большинства пациентов восстановились до нормальных концентрации иммуноглобулинов IgA и IgM в сыворотке крови; уровень IgG восстановился только у половины пациентов, в крови которых после иммунизации обнаруживались специфические к ряду бактериальных токсинов антитела.

К настоящему времени все пациенты, прошедшие генную терапию, живы, а состояние их здоровья в норме, за исключением одного пациента с остаточными признаками иммунодефицита легкой степени. В течение, по крайней мере, четырех лет после проведения терапии уровень функционирующей аденозиндезаминазы в клетках крови не снижался. Это действительно обнадеживающие результаты, поскольку смертность пациентов с дефицитом АДА после трансплантации костного мозга от неродственных и гаплоидентичных доноров в связи с развитием реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) составляет 37 и 70% соответственно [5, 13]. В данном случае исследователи не подвергли пациентов риску развития РТПХ, используя аутогенные клетки.

Исследователи считают, что ключевым фактором, сыгравшим роль в успехе этих клинических испытаний,

было применение бусульфана в дозах, не вызывающих тотальной миелоабляции. По-видимому, именно это позволило трансплантированным клеткам успешно прижиться в костном мозге, так как миелоаблятивная терапия затрудняет последующее восстановление гемопоэза [9–11]. Также важным оказался отказ от сопутствующей заместительной терапии с помощью ПЭГ-АДА. Ранее уже было продемонстрировано, что применение аналога аденозиндезаминазы подавляет пролиферацию ГСК, трансфецированных геном АДА [11, 12, 14]. Но работа научной группы А. Aiuti показала, что токсичные уровни пуриновых метаболитов в организме реципиентов ассоциируются с усиленной пролиферацией трансфецированных клеток и их клональной экспансией, особенно в лимфоидном направлении. Очевидно, что это происходит по механизму отрицательной обратной связи, но механизм этого процесса пока неясен.

Как можно более ранняя трансплантация трансфецированных клеток, по мнению авторов, способствует восстановлению функций иммунной системы, препятствуя инволюции тимуса.

Возможно, подобный подход действительно станет в будущем терапией выбора для пациентов с данной формой тяжелого комбинированного иммунодефицита, которым невозможно подобрать HLA-идентичного донора. Также принципиально он может быть применен в лечении пациентов с другими типами наследственных заболеваний кроветворной системы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hirschhorn R., Candotti F. Immunodeficiency due to defects of purine metabolism. In: Ochs H, Smith C, Puck J, eds. Primary immunodeficiency diseases. Oxford, England: Oxford University Press, 2006: 169–96.
2. Hershfield M.S. Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy. Semin. Hematol. 1998; 35:291–8.
3. Rogers M.H., Lwin R., Fairbanks L. et al. Cognitive and behavioral abnormalities in adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency. J. Pediatr. 2001;139:44–50.
4. Hoenig M., Albert M.H., Schulz A. et al. Patients with adenosine deaminase deficiency surviving after hematopoietic stem cell transplantation are at high risk of CNS complications. Blood 2007; 109: 3595–602.
5. Antoine C., Mueller S., Cant A. et al. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968–99. Lancet 2003; 361: 553–60.
6. Grunebaum E., Mazzolari E., Porta F. et al. Bone marrow transplantation for severe combined immune deficiency. JAMA 2006; 295: 508–18.
7. Malacarne F., Benicchi T., Notarangelo L.D. et al. Reduced thymic output, increased spontaneous apoptosis and oligoclonal B cells in polyethylene glycol-adenosine deaminase-treated patients. Eur. J. Immunol. 2005; 35: 3376–86.

8. Chan B., Wara D., Bastian J. et al. Long term efficacy of enzyme replacement therapy for adenosine deaminase (ADA)-deficient severe combined immunodeficiency (SCID). Clin. Immunol. 2005; 117: 133–43.
9. Bordignon C., Notarangelo L.D., Nobili N. et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. Science 1995; 270: 470–5.
10. Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D. et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. Science 1995; 270: 475–80.
11. Kohn D.B., Hershfield M.S., Carbonaro D. et al. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34⁺ cells in ADA-deficient SCID neonates. Nat. Med. 1998; 4: 775–80.
12. Aiuti A., Slavin S., Aker M. et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. Science 2002; 296: 2410–3.
13. Booth C., Hershfield M., Notarangelo L. et al. Management options for adenosine deaminase deficiency; proceedings of the EBMT satellite workshop (Hamburg, March 2006). Clin. Immunol. 2007; 123: 139–47.
14. Gaspar H.B., Björkgren E., Parsley K. et al. Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. Mol. Ther. 2006; 14: 505–13.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Aiuti A., Cattaneo F., Galimberti S. et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. The New England Journal of Medicine 2009; 5(360): 447–58