

# НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

## КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

### Облучение определяет отрицательный эффект применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора после аллогенной трансплантации костного мозга

Широко применяющийся для лечения злокачественных гематологических заболеваний метод трансплантации костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), полученных из периферической крови после мобилизации в сосудистое русло, включает применение на подготовительном этапе протоколов, направленных на ликвидацию трансформированных клеток. Они могут включать в себя как применение высоких доз химиопрепаратов, так и тотальное облучение организма. Так как в большинстве случаев выполняются аллогенные трансплантации костного мозга, в послеоперационном периоде приходится «балансировать» между, с одной стороны, восстановлением гранулоцитоза для предотвращения фатальных инфекционных осложнений, а с другой, профилактикой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ).

В первый месяц после трансплантации основные усилия направлены на восстановление клеток иммунной системы, которое оценивается, в основном, по количеству гранулоцитов в крови и считается достаточным для предотвращения гибели от инфекционных осложнений при их уровне порядка 500/мл и более (минимально допустимо – 100/мл. [1]). Без применения стимулирующих воздействий концентрация гранулоцитов 500/мл достигается после трансплантации костного мозга в среднем за три, а при введении ГСК, полученных из периферической крови, – за две недели [2]. В этой связи, для ускорения восстановления иммунной системы используют ряд дополнительных воздействий, как то введение биологически активных веществ, активирующих гранулоцитопоз, или лимфоцитарных масс.

Показано, что использование гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) после трансплантации костного мозга сокращает время достижения необходимой концентрации гранулоцитов (500/мл) до 5–6 сут., а в случае введения ГСК, полученных из периферической крови, – до 3–4 сут. [2]. Вместе с тем, на данный момент нет однозначных данных об отрицательном эффекте применения Г-КСФ: одни авторы отмечают увеличение частоты развития РТПХ при использовании G-CSF [3], другие связи между его введением и РТПХ не наблюдают [4, 5].

В этой связи, значительный интерес представляет исследование E. Morris с соавт. (2009), в определенной степени раскрывающее механизм побочного действия Г-КСФ и объясняющее тем самым причины противоре-

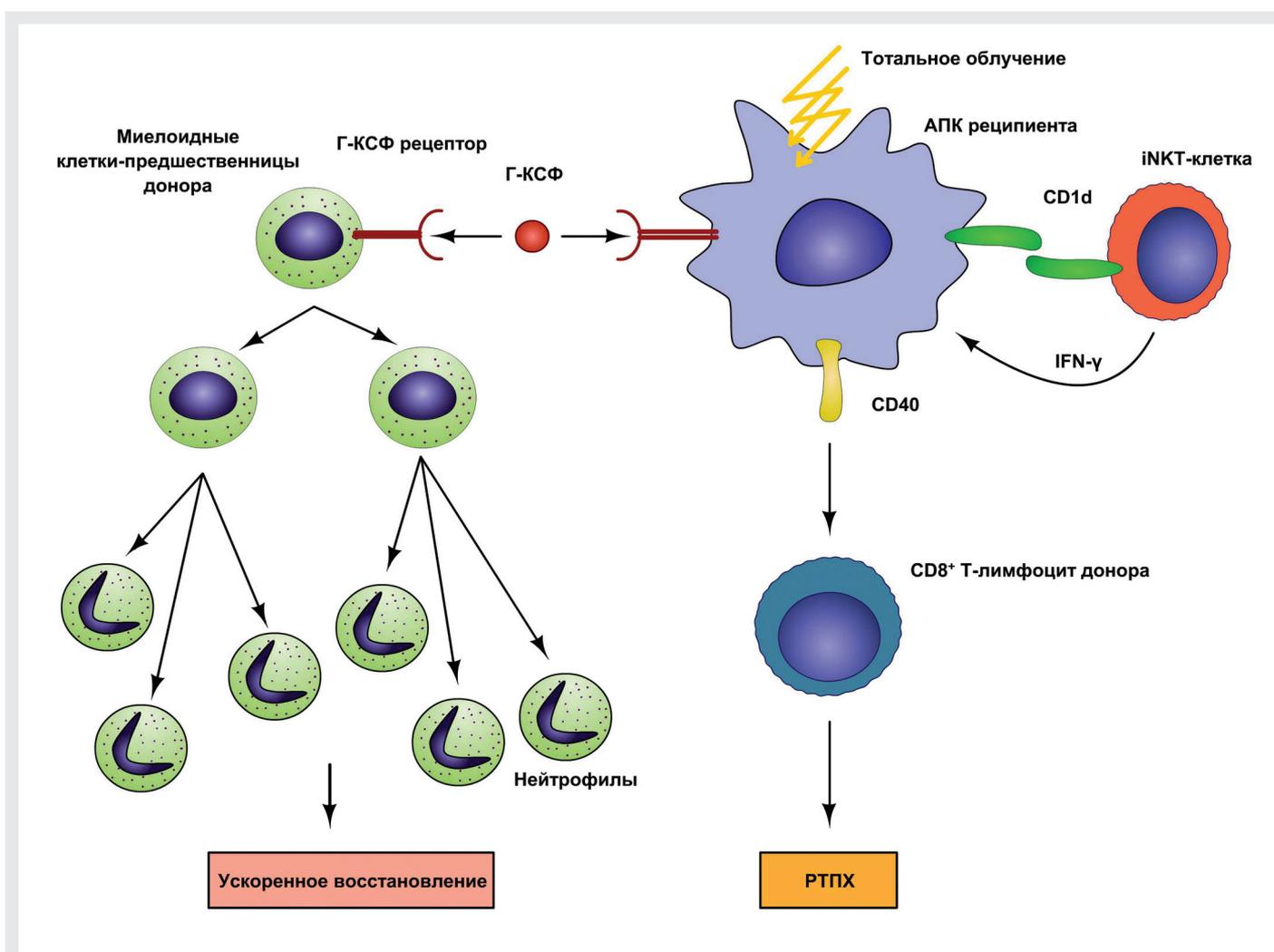
чивости данных более ранних исследований. Работа была выполнена на мышах с моделью РТПХ, полученной после аллогенной трансплантации костного мозга. Смерть животных контрольной группы (без применения дополнительных вмешательств) от РТПХ наблюдалась в среднем через 47 сут., а введение Г-КСФ (по 2 мг один раз в сутки в течение первых 10 сут., подкожно) в посттрансплантационном периоде уменьшало время выживаемости до 25–27 сут.

Авторы показали, что ускорение развития РТПХ было обусловлено увеличением количества CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, а также сопровождалось резким транзиторным увеличением концентрации  $\gamma$ -интерферона в сыворотке крови в первые дни после трансплантации, связанным с ростом уровня и активности продуцирующих его iNKT-клеток. Более того, применение Г-КСФ в случае аллогенной трансплантации костного мозга, полученного от доноров, генетически дефицитных в отношении iNKT-клеток, не приводило к уменьшению срока выживаемости. Кроме того, эффект Г-КСФ не наблюдался в случае использования в качестве реципиентов животных с генетически обусловленным отсутствием рецептора к Г-КСФ.

Одним из ключевых звеньев развития РТПХ являются дендритные клетки реципиента [6]. Г-КСФ стимулирует экспрессию дендритными клетками CD1d, который участвует в активации iNKT-клеток, индуцируя продукцию ими  $\gamma$ -интерферона.  $\gamma$ -интерферон, в свою очередь, усиливает экспрессию антигенпрезентирующими клетками корецептора CD40 [7]. Через CD40 дендритные клетки оказывают активирующее влияние на CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, непосредственно вовлеченные в реакцию отторжения [6]. Установив, что введение Г-КСФ существенно ускоряет скорость развития реакции «трансплантат против хозяина», что соответствует данным O. Ringden с соавт. (2004), исследователи задались вопросом, почему аналогичные результаты не наблюдались в работе, выполненной H. Khoury с соавт. (2006) под эгидой международного регистра трансплантации костного мозга (International Bone Marrow Transplant Registry). Оказалось, что в исследовании O. Ringden с соавт. (2004) на претрансплантационном этапе применялось, в основном, кондиционирование тотальным облучением, а H. Khoury (2006) использовал миелоабляцию химиотерапией. В этой связи, E. Morris с соавт. (2009) показали, что именно облучение, а не химиотерапия,

вызывает транзиторную (в течение первой недели) сенсibilизацию дендритных клеток к действию Г-КСФ за счет увеличения уровня экспрессии его рецептора. При этом в эксперименте *in vitro* индуцирующее действие облучения на продукцию рецептора Г-КСФ дендритными клетками не было воспроизведено, что указывает на вовлечение в процесс сенсibilизации каких-либо промежуточных веществ, образующихся в организме под действием радиоактивного излучения.

Таким образом, протоколы миелоабляции, применяющиеся в претрансплантационном периоде, оказывают влияние на клинический эффект дальнейших посттрансплантационных мероприятий. Так, использование тотального облучения предопределяет необходимость отказа от введения Г-КСФ в первую неделю посттрансплантационного периода, что позволит нивелировать ускорение развития реакции «трансплантат против хозяина».



Введение пациенту с трансплантацией гемопоэтических клеток гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) приводит к ускорению восстановления количества гранулоцитов (левая сторона). Однако, если в претрансплантационном периоде в качестве прекодиционирования использовалось тотальное облучение, введение Г-КСФ также отягощает реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) (правая сторона); АПК – антиген презентующая клетка

ЛИТЕРАТУРА:

1. Offner F., Schoch G., Fisher L.D. et al. Mortality hazard functions as related to neutropenia at different times after marrow transplantation. *Blood* 1996; 88(10): 4058–62.
2. Dekker A., Bulley S., Beyene J. et al. Meta-analysis of randomized controlled trials of prophylactic granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after autologous and allogeneic stem cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24(33): 5207–15.
3. Ringden O., Labopin M., Gorin N.C. et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia increases the risk of graft-versus-host disease and death: a study from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22(3): 416–23.

4. Ho V.T., Mirza N.Q., Junco D.D. et al. The effect of hematopoietic growth factors on the risk of graft-vs-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32(8): 771–5.
5. Khoury H.J., Loberiza F.J., Ringden O. et al. Impact of posttransplantation G-CSF on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2006; 107(4): 1712–6.
6. Shlomchik W.D., Couzens M.S., Tang C.B. et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; 285(5426): 412–5.
7. Morris E.S., MacDonald K.P., Hill G.R. Stem cell mobilization with G-CSF analogs: a rational approach to separate GVHD and GVL? *Blood* 2006; 107: 3430–5.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Morris E.S., MacDonald K.P., Kuns R.D. et al. Induction of natural killer T cell-dependent alloreactivity by administration of granulocyte colony-stimulating factor after bone marrow transplantation. *Nat. Med.* 2009; 15 (4): 436–41.

## Обновление кардиомиоцитов у человека — новые доказательства

Для изучения пролиферативной активности клеток разных типов *in vivo* успешно используются радиоактивно меченые аналоги нуклеотидов (например,  $^3\text{H}$ -тимидин и бромдезоксигуанидин), которые встраиваются в ДНК активно делящихся клеток. Это позволяет не только выяснить долю делящихся клеток в данный момент времени (как в случае определения маркеров пролиферации, например Ki-67), но и узнать, сколько новых клеток образовалось в данной ткани или органе в течение длительного периода. Этот подход лежит в основе множества исследований на животных, и за многие годы он всецело оправдал свою эвристическую ценность. Однако экстраполировать полученные результаты на человека нужно с большой осторожностью. Ведь очевидным будет предположить, что регенеративный потенциал тканей у мыши нескольких месяцев от рождения и у пожилого человека будут отличаться.

Тем не менее, важность выяснения реального потенциала тканей человека к обновлению нельзя переоценить. Так, многие заболевания связаны с нарушениями клеточной регенерации, поэтому усиление естественного потенциала клеток к восстановлению с помощью фармакологических препаратов может стать перспективным направлением в лечении ряда патологических состояний, в том числе инфаркта миокарда. Но как оценить обновление клеток человека *in vivo*, не имея возможности их пометить?

Важной вехой в решении этой проблемы стала работа группы исследователей из Каролинского института (Стокгольм, Швеция), возглавляемой проф. Jonas Frisen, которые в 2005 г. опубликовали способ ретроспективного анализа клеточной пролиферации у человека [1]. Ученые подтвердили неожиданный факт: невольно, человечество уже осуществило масштабный эксперимент по радиоактивному мечению своих клеток. Действительно, наземные испытания ядерного оружия, проводившиеся в 1950-х и начале 1960-х гг., стали причиной многократного увеличения концентрации изотопа углерода  $^{14}\text{C}$  в атмосфере Земли. После того, как в 1963 г. США, СССР и Великобритания подписали «Договор о запрещении испытаний ядерного оружия в атмосфере, космическом пространстве и под водой», началось экспоненциальное снижение уровня  $^{14}\text{C}$  в атмосфере за счет аккумуляции изотопа в Мировом океане и биосфере [2].  $^{14}\text{C}$  в составе углекислого газа аккумулировался в растениях и передавался по пищевым цепям, в итоге накапливаясь в клетках человека, в том числе в самой долгоживущей молекуле — в ДНК. Таким образом, уровень углерода  $^{14}\text{C}$  в геномной ДНК отражает возраст клетки: путем сопоставления содержания  $^{14}\text{C}$  в клеточной популяции с концентрацией изотопа в атмосфере можно получить примерный «день рождения» клетки в организме. Очевидно, что концентрация  $^{14}\text{C}$  в ДНК клеток с очень низким регенеративным потенциалом будет близка по значению к концентрации  $^{14}\text{C}$  в атмосфере в год рождения человека. Напротив, в активно пролиферирующих клетках уровень геномного  $^{14}\text{C}$  будет близок к его концентрации в атмосфере в момент взятия образца (в случае анализа аутопсийного материала из банков тканей — в момент смерти человека).

Используя предложенный подход, исследовательская группа J. Frisen доказала, что у человека нейроны коры головного мозга не делятся в постнатальном периоде [3], а обновление адипоцитов происходит регулярно, со скоростью 10% клеток в год [4]. Этот же метод был положен в основу работы, опубликованной в журнале Science от 3 апреля, в которой O. Bergmann с соавт. решили выяснить один из фундаментальных вопросов физиологии и медицины: способны ли к обновлению кардиомиоциты человека?

Результаты многочисленных исследований на грызунах с использованием меченых аналогов нуклеотидов, проведенные за последние 40 лет, не дали ясного ответа о регенеративном потенциале клеток сердца [5]. В пользу такой возможности свидетельствует обнаружение у мышей кардиальных клеток-предшественников, которые, по-видимому, отвечают за фоновое обновление кардиомиоцитов в течение жизни [6, 7]. Более того, было обнаружено, что сами зрелые кардиомиоциты могут снова входить в клеточный цикл и делиться [6]. С другой стороны, полагают, что пролиферация клеток сердца может происходить только при повреждении сердечной мышцы [8].

На первом этапе авторы провели анализ содержания  $^{14}\text{C}$  в образцах тканей сердца, полученных при аутопсии либо из Британского банка тканей человека, с помощью акселераторной масс-спектрометрии. У людей, родившихся в период ядерных испытаний (когда концентрация  $^{14}\text{C}$  в атмосфере была высока), уровень  $^{14}\text{C}$  в клетках миокарда соответствовал концентрации изотопа, наблюдавшейся в атмосфере через несколько лет после их рождения, что говорит о синтезе ДНК в клетках миокарда в постнатальном периоде. Поскольку эти данные не позволяют выяснить, происходит ли синтез ДНК (а значит, деление клеток) в более позднем возрасте, O. Bergmann с соавт. провели аналогичный анализ у людей, родившихся до периода ядерных испытаний. Во всех исследованных образцах (в том числе принадлежавших людям, которые родились за 22 года до ядерных испытаний) содержание  $^{14}\text{C}$  было повышено. Это означает, что синтез ДНК в клетках миокарда человека происходит спустя многие годы после рождения, свидетельствуя о постнатальном обновлении тканей сердца.

Тем не менее, эти предварительные результаты не давали ответа на вопрос, какие именно клетки миокарда делятся, поскольку зрелые кардиомиоциты составляют около 20% среди других клеток сердца — эндотелиальных клеток, фибробластов, гладкомышечных клеток и лейкоцитов [9]. Поэтому авторы решили с помощью проточной FACS-сортировки выделить клеточные ядра, экспрессирующие специфические для кардиомиоцитов маркеры — кардиальные тропонин I и тропонин T (соответственно TNNT1 и TNNT2). Поскольку кардиомиоциты экспрессируют оба белка, для сортировки был выбран один из маркеров — тропонин T. Авторы подтвердили, что тропонин T<sup>+</sup> фракция ядер экспрессирует другие маркеры кардиомиоцитов (Nkx2.5, GATA4) и не несет маркерных генов эндотелиальных клеток (vWF), фибробластов (виментин), гладкомышечных клеток

(АСТА2) и лейкоцитов (CD45). Повторив вышеописанные эксперименты по оценке содержания  $^{14}\text{C}$  уже на очищенных ядрах кардиомиоцитов (степень очистки 96%), O. Bergmann с коллегами подтвердили, что у людей, родившихся как до, так и во время ядерных испытаний, в постнатальном периоде отмечается синтез ДНК в самих кардиомиоцитах.

Известно, что накопление  $^{14}\text{C}$  (синтез ДНК) в кардиомиоцитах может быть связано не только с клеточной пролиферацией, но и с полиплоидизацией клеток в раннем постнатальном периоде (примерно до 10 лет), а также у взрослых в результате повышенной нагрузки на сердце при сердечно-сосудистой патологии. Кроме того, на содержании  $^{14}\text{C}$  в ДНК могли отразиться такие процессы как слияние кардиомиоцитов с другими клетками и удаление нуклеотидов при репарации ДНК. Авторы оценили вклад каждого из этих событий в накопление  $^{14}\text{C}$  в ядерной ДНК, чтобы выяснить истинный потенциал кардиомиоцитов к регенерации. Так, изменения концентрации  $^{14}\text{C}$  вследствие слияния клеток и при репарации ДНК столь незначительны, что лежат ниже границы чувствительности использованного метода детекции. Далее, у людей с сердечной патологией в анамнезе не было отмечено ни значимой гипертрофии миокарда, ни патологической полиплоидии кардиомиоцитов. Более того, моделирование кинетики синтеза ДНК и накопления  $^{14}\text{C}$  показало, что выявленные концентрации  $^{14}\text{C}$  в кардиомиоцитах не могут быть следствием полиплоидизации клеток в зрелом возрасте.

Единственным процессом, который отразился на результатах исследования, была полиплоидизация кардиомиоцитов в детском возрасте, однако, как выяснили авторы, накопление  $^{14}\text{C}$  в кардиомиоцитах нельзя объяснить исключительно как следствие их полиплоидизации. Действительно, повышенное содержание  $^{14}\text{C}$  в кардиомиоцитах людей, которым к моменту увеличения уровня  $^{14}\text{C}$  в атмосфере было уже больше 10 лет, говорит в пользу обновления клеток сердца в более зрелом возрасте. Кроме того, исследователи рассчитали для каждого образца величину поправки, обусловленной полиплоидизацией кардиомиоцитов в детстве, что позволило получить истинные значения содержания  $^{14}\text{C}$ . Таким образом, исключив наиболее вероятные причины накопления изотопа  $^{14}\text{C}$ , не связанные с клеточной пролиферацией, O. Bergmann с соавт. получили веские основания утверждать, что кардиомиоциты человека способны к фоновому обновлению в течение жизни.

В заключение, на основе полученных данных авторы апробировали несколько математических моделей для выяснения динамики пролиферации кардиомиоцитов. Модель обратного линейного снижения, наиболее соответствующая экспериментальным данным, показала, что в возрасте 25 лет у человека делятся около 1% кардиомиоцитов в год, а к 75 годам их доля снижается до 0,45%. В соответствии с таким уровнем пролифе-

рации большинство кардиомиоцитов ни разу не делится в течение жизни. С другой стороны, клетки миокарда, отличные от кардиомиоцитов, характеризуются значительно более высоким уровнем обновления (18% клеток в год, 4 года — средний возраст одной клетки).

Эти результаты, однако, не дали ответа на вопрос, каким образом кардиомиоциты человека обновляются. Образуются ли они из кардиальных клеток-предшественников либо стволовых клеток или же пролиферируют уже зрелые клетки? Отметим, что оценить вклад ранних клеток-предшественников в обновление зрелых кардиомиоцитов с помощью данного подхода весьма сложно. Во-первых, количество клеток, необходимое для анализа  $^{14}\text{C}$ , превышает 15 миллионов, а популяции  $\text{Isl1}^+$ ,  $\text{Lin}^-$ ,  $\text{c-Kit}^+$  и  $\text{Sca-1}^+$  клеток, относимых к кардиальным клеткам-предшественникам, чрезвычайно редки (0,01% и менее) [10–12]. Во-вторых, сам факт накопления ДНК-метки не всегда свидетельствует о принадлежности клетки к стволовым [13, 14]. В-третьих, ни  $\text{Isl1}^+$  ни  $\text{Lin}^-$ ,  $\text{c-Kit}^+$   $\text{Sca-1}^+$  популяции клеток-предшественников не экспрессируют кардиальные тропонины I и T [10, 11], и поэтому для включения этих клеток в анализ нужен маркер, общий для незрелых и дифференцированных клеток сердца, например  $\text{Nkx2.5}$  или  $\text{GATA4}$  [10].

Таким образом, работа J. Frisen и его коллег подтверждает способность зрелых кардиомиоцитов человека к фоновому обновлению в течение длительного периода после рождения. Насколько физиологически значима пролиферация менее чем 1% клеток сердца? Сравнивая сердце с головным мозгом, также исторически относимым к стационарным клеточным популяциям, обнаруживается существенная разница. Действительно, большинство нейронов остаются «вне клеточного цикла» с самого рождения, однако в головном мозге в связи с его функциональной гетерогенностью имеются «горячие точки», где отмечается активное обновление нервных клеток [15]. Другой пример: печень, для которой, как и для сердца, характерна низкая скорость гомеостатического обновления клеток, тем не менее, обладает выраженным регенеративным потенциалом: при повреждении зрелые гепатоциты активно делятся, восстанавливая значительную часть органа [16]. Конечно, после инфаркта миокарда у мышей также отмечается пролиферация кардиомиоцитов, но степень ее существенно меньше [8]. Комментируя данную публикацию, Kenneth Chien из Гарвардского института стволовых клеток полагает, что доказательство даже незначительного пролиферативного потенциала клеток сердца может стать прочным основанием для создания лекарственных препаратов, усиливающих обновление кардиомиоцитов. «Данные, полученные на животных, показывают, что даже частичное восстановление сердечной мышцы может оказаться подобным «Большому взрыву» в функциональном плане» [17]. Так ли это для человека — покажет будущее.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Spalding K.L., Bhardwaj R.D., Buchholz B.A. et al. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 2005; 122(1): 133–43.
2. Nydal R., Luvseth K. Distribution of radiocarbon from nuclear tests. *Nature* 1965; 206(9888): 1029–1031.
3. Bhardwaj R.D., Curtis M.A., Spalding K.L. et al. Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *PNAS* 2006; 103(33): 12564–8.
4. Spalding K.L., Arner E., Westermarck P.O. et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; 453(7196): 783–787.
5. Soonpaa M.H., Field L.J. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ. Res.* 1998; 83(1): 15–26.
6. Anversa P., Kajstura J., Leri A., Bolli R. Life and death of cardiac

- stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 2006; 113(11): 1451–63.
7. Martin-Puig S., Wang Z., Chien K.R. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4): 320–31.
8. Hsieh P.C., Segers V.F., Davis M.E. et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat. Med.* 2007; 13(8): 970–4.
9. Rubart M., Field L.J. Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu. Rev. Physiol.* 2006; 68: 29–49.
10. Laugwitz K.L., Moretti A., Lam J. et al. Postnatal  $\text{Isl1}^+$  cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433(7026): 647–53.

11. Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D. et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *PNAS* 2003; 100(21): 12313–8.

12. Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114(6): 763–76.

13. Kiel M.J., He S., Ashkenazi R. et al. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 2007; 449(7159): 238–42.

14. Conboy M.J., Karasov A.O., Rando T.A. High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS Biol.* 2007; 5(5): e102.

15. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 2003; 6(11): 1127–34.

16. Dorrell C., Grompe M. Adult liver stem cells. In: *Essentials of stem cell biology*. Elsevier Academic Press; ed.: R. Lanza et al. — Boston. — P. 237–244.

17. Baker M. Carbon dating shows humans make new heart cells. *Nature Reports Stem Cells*. Published online: 9 April 2009.

Подготовил А.А. Леявский

По материалам: Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; 324(5923): 98–102.

## Тканеспецифичные хроматин моделирующие комплексы — ключ к успеху трансдифференцировки клеток?

Томас Граф (Thomas Graf), известный своими работами по перепрограммированию лимфоцитов в макрофаги [1], в интервью, данном в октябре 2008 г. *Nature Reports Stem Cells*, сказал: «Не присоединяйтесь к iPS-мании, если у вас нет уникальной точки зрения или вопроса. Прямая трансдифференцировка может стать новой горячей областью; и эта область еще не перенаселена».

Прямая трансдифференцировка клеток, то есть получение дифференцированных клеток одного типа из специализированных клеток другого типа, может являться одним из источников клеточного материала для регенеративной медицины. При этом в случае успеха данного подхода следует ожидать разработки более простых терапевтических протоколов, чем при использовании плюрипотентных клеток.

Примером прямой трансдифференцировки является работа упомянутого выше Томаса Графа с соавторами по перепрограммированию коммитированных T-лимфоцитов в макрофаги [1] или опыт по перепрограммированию *in vivo* панкреатических экзокриноцитов в инсулин-продуцирующие  $\beta$ -клетки, проведенный под руководством Дугласа Мелтона (Douglas Melton) [2]. В этих двух исследованиях для изменения фенотипа клеток использовали трансфекцию специфическими транскрипционными факторами. Следует напомнить, что набор из четырех транскрипционных факторов использовался и в революционной работе Синья Яманака (Shinya Yamanaka) по получению из фибробластов мыши плюрипотентных клеток [3].

В июньском выпуске *Nature* опубликовано письмо Джуна Такеучи (Jun K. Takeuchi) и Бенуа Брюно (Benoit G. Bruneau), сообщающее об успешной трансдифференцировке клеток некардиогенной мезодермы эмбриона мыши в кардиомиоциты [4]. Залогом успеха перепрограммирования клеток авторы считают использование наряду с транскрипционными факторами Gata4, Nkx2-5 и Tbx5 необходимого для развития сердца компонента хроматин-моделирующего VAF-комплекса — Vaf60c [5].

Хроматин-моделирующий VAF-комплекс состоит из 11 субъединиц, кодируемых 20 генами (рис.). Этот комплекс регулирует присутствие и положение нуклеосом на ДНК, разрешает связывание транскрипционных факторов

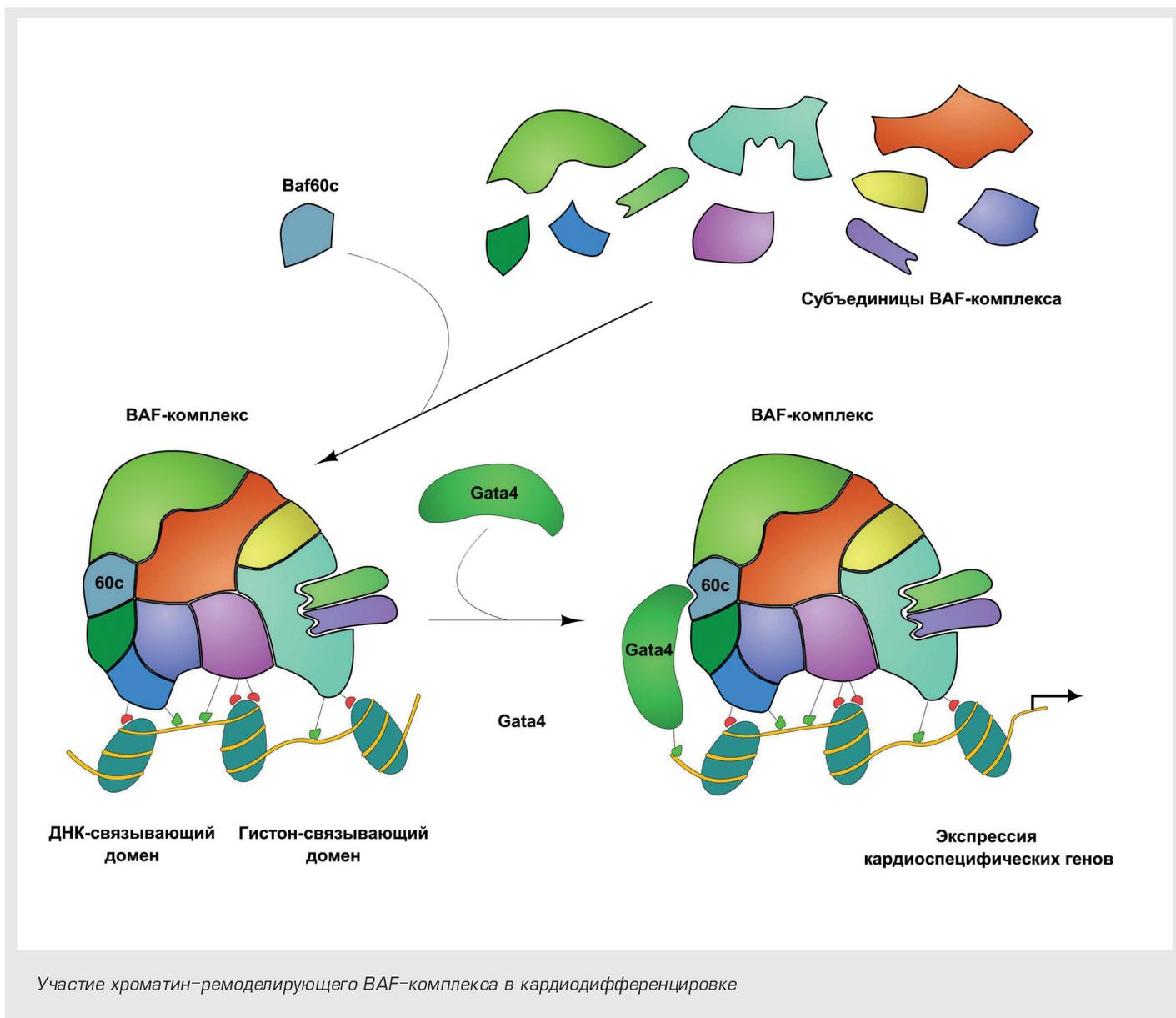
с нуклеосомами, участвует в считывании гистонного кода, а также способствуют рекомбинации и репарации ДНК [6]. Разные комбинации сборки субъединиц в VAF-комплекс встречаются в различных тканях, например, субъединицы Vaf45a и Vaf45b характерны для нейрональных предшественников и постмитотических нейронов, субъединица Vaf45c в основном экспрессируется в клетках эмбрионального сердца, а субъединицы Vaf45a и Vaf45d — в эмбриональных стволовых клетках [7]. В исследовании, выполненном в 2004 г. под руководством Бенуа Брюно, было показано, что ген Vaf60c экспрессируется в сердце на ранних этапах эмбрионального развития, а полное или частичное подавление экспрессии этого гена при помощи РНК-интерференции ведет к нарушению морфогенеза сердца [5].

В текущей работе авторы трансфецировали культивируемые *in vitro* эмбрионы мыши векторами, содержащими гены Vaf60c и трех транскрипционных факторов Gata4, Nkx2-5 и Tbx5, важных для активации генов, специфичных для развития сердца. В качестве основного маркера запуска начальных этапов кардиодифференцировки использовалась экспрессия гена Actc1, кодирующего специфичный для кардиомиоцитов альфа-актин. При трансфекции, проведенной между 6 и 9 сут. эмбрионального развития, наблюдалась эктопическая индукция экспрессии Actc1 в клетках некардиогенной мезодермы в 9 из 11 трансфецированных эмбрионов. Помимо экспрессии Actc1 в трансфецированных клетках наблюдалась экспрессия и других генов кардиодифференцировки, таких как ген cTnT (кардиоспецифичный тропонин T),  $\alpha$ -TM ( $\alpha$ -тропомиозин) и Myl2 (миозин 2). О полноте трансдифференцировки в ткань сердца говорит появление в области некардиогенной эмбриональной мезодермы сокращающихся кардиомиоцитов в 9 из 16 трансфецированных эмбрионов.

В этом исследовании показано, что для эктопической индукции сокращающейся сердечной ткани в некардиогенной мезодерме необходимым минимумом является применение двух транскрипционных факторов Gata4 и Tbx5 в сочетании с компонентом хроматин-моделирующего VAF-комплекса Vaf60c. Vaf60c ассоциируется с Gata4 и тем самым обеспечивает связывание этого транс-

крипционного фактора с регуляторными участками генов-мишеней (рис.). Использование Gata4 и Baf60c без Tbx5 ведет к эктопической индукции экспрессии транскрипционного фактора Nkx2-5 и раннего кардиомакера Actc1, но не к образованию сокращающихся кардиомиоцитов. Данные факты позволяют поместить хроматин-моделирующий комплекс Baf60c на самый верх иерархии генетического контроля развития сердца.

В заключение надо отметить, что описанный выше опыт по трансдифференцировке *in vivo* клеток некардиогенной мезодермы в кардиомиоциты позволил не только определить ключевые детерминанты ранних этапов кардиогенеза, но и дает надежду, что сходный подход с применением различных тканеспецифичных компонентов хроматин-моделирующего комплекса можно применить при дифференцировке других типов клеток.



ЛИТЕРАТУРА:

1. Laiosa C., Stadtfeld M., Xie H., de Andres-Aguayo L., Graf T. Reprogramming of Committed T Cell Progenitors to Macrophages and Dendritic Cells by C/EBP $\beta$  and PU.1 Transcription Factors. *Immunity* 2006; 25(5): 73–144
2. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to  $\beta$ -cells. *Nature* 2008; 455: 627–32.
3. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.
4. Takeuchi J.K., Bruneau B.G. Directed transdifferentiation of mouse

- mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 2009; 459(7247): 708–11.
5. Lickert H., Takeuchi J.K., Von Both I. Et al. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* 2004; 432(7013): 107–12.
6. Wu J.L., Lessard J., Crabtree G.R. Understanding the words of chromatin regulation. *Cell* 2009; 136(2): 200–6.
7. Ho L., Jothi R., Ronan J.L. et al. An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *PNAS* 2009; 106(13): 5187–91.
8. Liang F.S., Crabtree G.R. Developmental biology: The early heart remodelled. *Nature* 2009; 459(7247): 654–5.

Подготовила А. Богомазова  
 По материалам: Takeuchi J.K., Bruneau B.G. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 2009; 459(7247): 708–11.

## Сигнальный путь Hedgehog не влияет на функционирование гемопоэтических стволовых клеток

Сигнальный путь Hedgehog не влияет на функционирование гемопоэтических стволовых клеток. Ген Hedgehog (Hh) был открыт С. Nusslein-Volhard и Е. Wieschauss в 1980 г. в организме плодовой мушки *D. melanogaster* [1], за что они были удостоены Нобелевской премии. Позже аналоги данного гена были обнаружены и у позвоночных, включая человека. Сигнальный путь, который активируется Hh, и имеет аналогичное название, вместе с Notch и Wnt сигнальными каскадами играет важную роль в процессах эмбрионального развития организма [2]. Инактивация Hh сигнального пути вызывает дефекты развития, например голопрозэнцефалию. В то же время, гиперактивация данного каскада наблюдается в клетках некоторых типов злокачественных опухолей (базальноклеточный рак и др.), что способствует метастазированию [3] и активации ангиогенеза [4].

Сигнальные механизмы Hh пути высококонсервативны от насекомых до человека. Ключевым трансдуктором данного сигнального пути является трансмембранный белок Smoothed (Smo) и, его активность ингибируется другим трансмембранным белком Ptch, который представляет собой клеточный рецептор для Hh лигандов (см. рис.). При связывании Hh с Ptch ингибирующий блок SMO снимается, вследствие чего последний активирует группу факторов транскрипции Gli, которые активируют целевые гены путем прямого взаимодействия со специфическими областями в области промотора. Главными целевыми генами данного сигнального пути являются глиома-ассоциированные онкогены *GLI1* и *GLI2*, а также гены *PTCH1* и *HHIP*. Активация этих генов определяет ряд клеточных реакций, а именно, активацию пролиферации [5], антиапоптотических сигналов [6] и др.

Работами последних лет была продемонстрирована роль Hh сигнального пути в функционировании гемопоэтической системы, а именно в процессах созревания Т- и В-лимфоцитов, тимоцитов, во взаимодействии гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) с клетками стромы [7], самообновлении ГСК [8] и др. Также имеются сообщения про участие Hh сигнального пути в развитии BCR-Abl лейкоза, что делает возможным использование ингибиторов Hh сигнального каскада для терапии данного типа злокачественных новообразований [9]. Но работы, сфокусированные на роли Hh сигнального пути в функционировании ГСК на постнатальном этапе развития млекопитающих, до последнего времени практически отсутствовали.

В июньском номере журнала *Cell Stem Cell* были опубликованы две статьи, в которых изучалась роль Hh-зависимой сигнализации в функционировании взрослых ГСК и при некоторых типах лейкозов. Проведенные исследования позволили получить неожиданные результаты. Было показано практически полное отсутствие влияния Hh сигнального пути на основные процессы жизнедеятельности ГСК взрослых млекопитающих. Так, J. Gao и соавт. [10] продемонстрировали, что делеция белка Smo не влияет на функционирование ГСК, их потенциал к дифференцировке и самообновление. Также методом DNA-microarrays было показано практически полное совпадение профилей экспрессии ГСК дикого типа и нокаутных по Smo. При трансплантации костного моз-

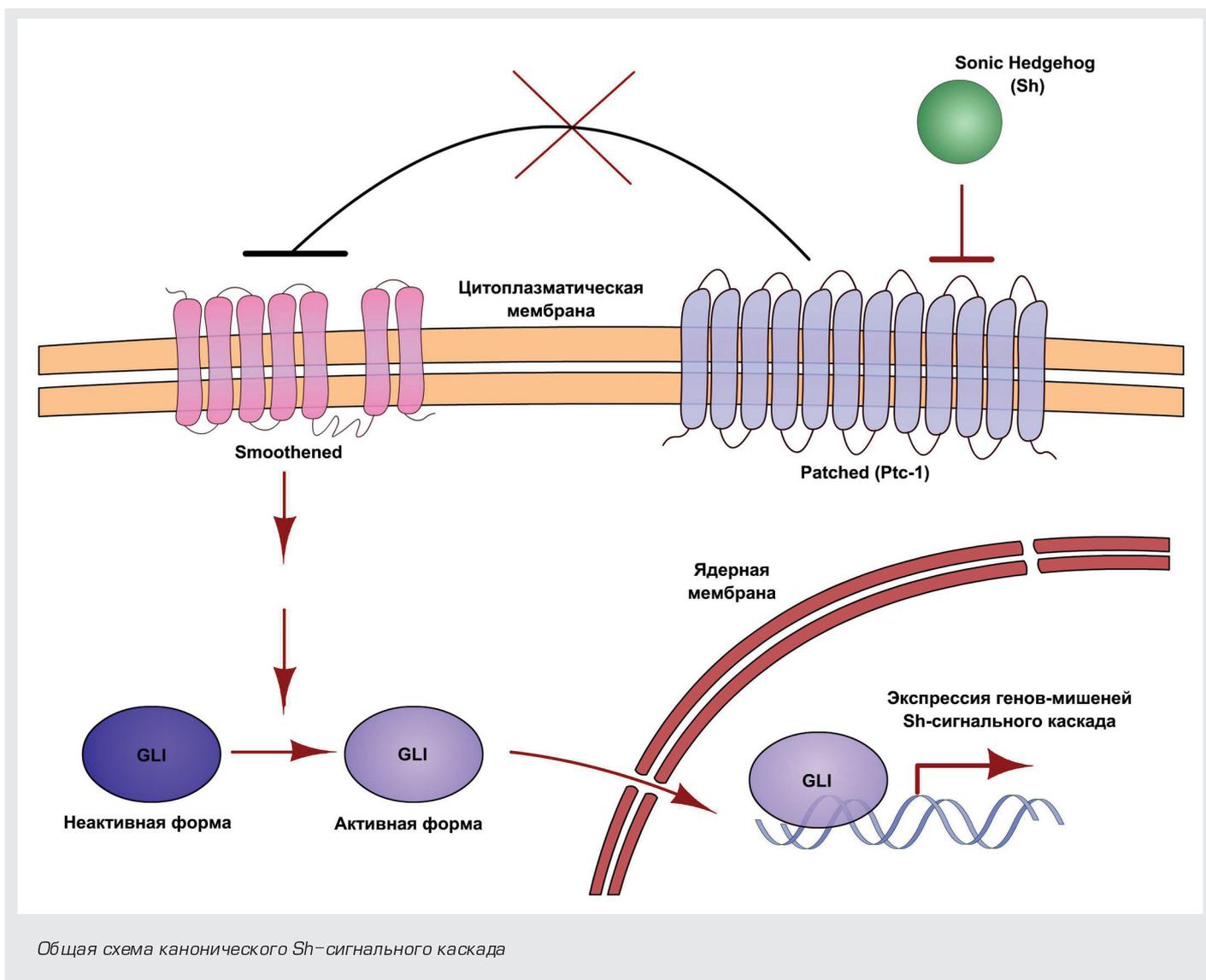
га (ТКМ) продемонстрирована одинаковая способность нормальных и нокаутных по SMO ГСК приживаться в организме реципиента. Отдельного внимания заслуживает результат, который отрицает широко распространенную гипотезу про синергизм в действии Hh и Notch сигнальных путей [11]. Так, авторами было показано, что при ТКМ с нокаутными по SMO клетками никаких дефектов в приживлении и дифференцировке не наблюдалось, тогда как одновременный нокаут SMO и RBPJ (один из ключевых белков Notch сигнального пути) вызывал сокращение количества Т-клеток и В-клеток в костном мозге, что свидетельствует о важной роли Notch сигнализации в дифференцировке ГСК и об отсутствии влияния на данный процесс Hh сигнального пути. В некоторых предыдущих работах [12] была продемонстрирована гиперактивация Hh сигнального пути при отдельных типах лейкозов, что дало возможность авторам этих работ выдвинуть гипотезу об участии Hh-сигнализации в процессах малигнизации. Авторы обсуждаемой работы, используя модель лейкоза, индуцированного гиперактивацией Notch1, продемонстрировали отсутствие достоверной разницы между кинетикой лейкогенеза при сверхэкспрессии Notch1 отдельно и в комбинации с делецией SMO, что опровергает гипотезу про участие Hh в развитии BCR-Abl лейкемии.

Авторами второй работы [13] были получены аналогичные результаты про отсутствие влияния Hh инактивации на процессы самообновления и пролиферативный потенциал ГСК. Кроме этого, в данной работе дополнительно установлено отсутствие изменений в количестве ГСК при делеции SMO. Также показано отсутствие изменений в динамике ответа ГСК на 5-фторурацил индуцированный стресс. Кроме этого, при исследовании влияния Hh сигнального каскада на развитие лейкоза была использована другая модель, в которой заболевание вызывалось MLL-AF9-ассоциированным аллелем. Результаты, полученные при использовании данной модели, были аналогичными по сравнению с предыдущей работой, где для индукции лейкоза использовалась гиперактивация Notch1 — тут также отмечалось отсутствие влияния делеции SMO на лейкогенез у подопытных животных.

Эти работы продемонстрировали отсутствие влияния Hh сигнального пути на практически все основные процессы жизнедеятельности ГСК взрослых, что является полностью противоположным результатом по отношению к предыдущим работам, которые демонстрируют важность Hh-сигнализации для дифференцировки зрелых ГСК [12, 14]. Авторы объясняют данные отличия некоторыми методическими неточностями в работах их предшественников, использованием другой модели животных и, что самое главное, неадекватностью метода делеции, использованного в работе С. Zhao и соавт. [12]. Утверждается, что метод делеции, использованный в этой работе, ведет к нокауту гена SMO не только в зрелых ГСК, а и во всех ГСК и эпителиальных клетках эмбриона, что может значительно исказить результаты исследований. Также следует отметить, что обсужденные в данной статье работы ставят под сомнение целесообразность использования ингибиторов Hh сигнального пути при терапии некоторых типов лейкозов,

что обуславливается отсутствием влияния делеции ключевого белка Hh сигнального каскада — Smo на процесс малигнизации BCR-Abl и MLL-AF9-ассоциированного лейкозов. Необходимо отметить, что роль Hh сигналь-

ного пути продемонстрирована для других типов опухолей [9], что позволяет полностью не отбрасывать возможность терапии злокачественных новообразований с помощью ингибиторов Hh сигнального каскада.



ЛИТЕРАТУРА:

1. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287: 795–801.
2. Rho J.Y., Yu K., Han J.S. Transcriptional profiling of the developmentally important signaling pathways in human embryonic stem cells. *Hum. Reprod.* 2006; 21(2): 405–12.
3. Feldmann G., Dhara S., Fendrich V. et al. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res.* 2007; 67: 2187–96.
4. Pola R., Ling L., Silver M. et al. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat. Med.* 2001; 7: 706–11.
5. Duman-Scheel M., Weng L., Xin S., Du W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 2002; 417: 299–304.
6. Bigelow R.L., Chari N.S., Uden A.B. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 1197–105.
7. Gering M, Patient R. Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev. Cell* 2005; 8: 389–400.

8. Stier S., Cheng T., Dombkowski D., Carlesso N., Scadden D.T. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 2002; 99: 2369–78.
9. Xie J. Implications of hedgehog signaling antagonists for cancer therapy. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2008; 40(7):670–80.
10. Gao J., Graves S., Koch U. et al. Hedgehog Signaling Is Dispensable for Adult Hematopoietic Stem Cell Function. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 548–58.
11. Sengupta A., Banerjee D., Chandra S. et al. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia* 2007; 21: 949–55.
12. Zhao C., Chen A., Jamieson C.H. et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 2009; 458(7239): 776–9.
13. Hofmann I., Stover E.H., Cullen D.E. et al. Hedgehog Signaling Is Dispensable for Adult Murine Hematopoietic Stem Cell Function and Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 559–67.
14. Trowbridge J., Scott M., Bhatia M. Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *PNAS* 2006; 103: 14134–9.

Подготовил В. Стадник

По материалам: Gao J., Graves S., Koch U. et al. Hedgehog Signaling Is Dispensable for Adult Hematopoietic Stem Cell Function. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 548–58. Hofmann I., Stover E.H., Cullen D.E. et al. Hedgehog Signaling Is Dispensable for Adult Murine Hematopoietic Stem Cell Function and Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 559–67.

## Белок Ezh2 управляет экспрессией генов для последовательной дифференцировки тканеспецифичных стволовых клеток

В настоящее время ведется интенсивное изучение механизмов, с помощью которых клетки — мультипотентные предшественницы контролируют развитие и поддержание клеточного состава различных тканей организма. Ранее на модели эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) млекопитающих было обнаружено, что активное участие в регуляции клеточной дифференцировки играют белки группы polycomb (Polycomb-repressor complexes, PRCs). Основной особенностью этой группы белков является способность ремоделировать хроматин. В результате их действия структура хроматина видоизменяется, что не позволяет транскрипционным факторам связываться с промоторными последовательностями ДНК. Модулируя структуру хроматина, белки группы polycomb играют важную роль в сайленсинге гомеозисных генов [1]. В результате их действия запускается эпигенетический механизм выключения экспрессии на уровне транскрипции. Одним из наиболее изученных белков этой группы является Ezh2 (Enhancer of zeste homolog 2). Он является метилтрансферазой, катализирующей триметилирование гистона H3 по лизину 27. Такая модификация хроматина запускает PRC-опосредованную эпигенетическую репрессию через компактизацию хроматина или через вмешательство регуляторов транскрипции [2].

Развивая данное направление исследований, международная команда под руководством Elaine Fuchs обнаружила, что белок Ezh2 контролирует пролиферативный потенциал базальных клеток в развивающемся эпидермисе млекопитающих. Препятствуя эпидермальной дифференцировке, Ezh2 репрессирует Ink4A-Ink4B локус и не позволяет активатору транскрипции AP1 преждевременно связаться со структурными генами.

При исследованиях была использована модель развивающегося эпидермиса мыши. Клетки эпидермиса берут свое начало от базальных клеток, которые являются мультипотентными предшественницами и располагаются на базальной мембране, отделяющей эпидермис от дермы. Базальные клетки последовательно производят около 10 слоев надбазальных клеток. Как только клетки покидают базальный слой, у них подавляется экспрессия пролиферативных генов и запускается программа терминальной дифференцировки, что приводит к последовательным морфологическим изменениям от шиповатого слоя к зернистому, клетки которого уже не делятся и превращаются в кератиноциты. Они формируют роговой слой и постепенно слущиваются. У зародыша мыши формирование слоистой структуры эпидермиса начинается на 14 сут. развития и завершается непосредственно перед рождением, когда от поверхности кожи требуется выполнение ее защитных функций [3]. Применение такой модели в сочетании с методикой культивирования клеток и использованием методов оценки экспрессии генов позволило авторам определить влияние экспрессии некоторых генов, в частности, Ezh2, на активацию транскрипции генов конечной дифференциации.

В результате исследований было обнаружено, что Ezh2 является критическим медиатором репрессии хроматина

в эмбриональных базальных клетках, а его экспрессия снижается с возрастом и детерминацией клеток к конечной дифференцировке. Наносимая этим белком на хроматин молекулярная метка (триметилирование гистона H3, triMeK27-H3) обнаружена методом иммунопреципитации в целом ряде неактивных генов. В первую очередь, метка triMeK27-H3 присутствует в молчащих эпидермальных генах у базальных клеток. Эти гены в норме активируются позже, во время терминальной дифференцировки клеток, которая наступает у клеток шиповатого и зернистого слоев. Метка triMeK27-H3 обнаружена авторами исследования также в генах, ответственных за другие (неэпидермальные) линии дифференцировки, таких как регуляторы транскрипции нервной и мышечной тканей.

Несомненный интерес представляет наблюдение авторов исследования о независимой регуляции процессов и темпов пролиферации клеток, запуска программы тканевой дифференцировки через молекулярный механизм с участием Ezh2. Несмотря на связь триметилирования гистона H3 с сайленсингом генов различных тканевых линий, потеря PRCs-опосредованной репрессии не влияет на судьбу эпидермальных клеток. Правильнее отметить, что происходит подавление пролиферации таких клеток через активацию локуса Ink4A-Ink4B, что ведет к возврату транскрипции генов, отвечающих за поздние стадии дифференцировки клеток эпидермиса. Этот процесс контролируется активаторами транскрипции AP1.

На клеточном уровне отсутствие экспрессии гена Ezh2 приводит к ускоренному формированию эпидермального барьера у зародышей, не влияя на послеродовое развитие.

Исследователи также продемонстрировали, что наносимая на хроматин белком Ezh2 метка triMeK27-H3 препятствует белкам AP1 связываться с генами-мишенями в базальных клетках, сохраняя их пролиферативный потенциал. Во время терминальной дифференциации клеток специфические гены теряют с гистонов метку, что ведет к активации транскрипции с помощью компонентов AP1 и приобретению клетками характеристик надбазальных слоев.

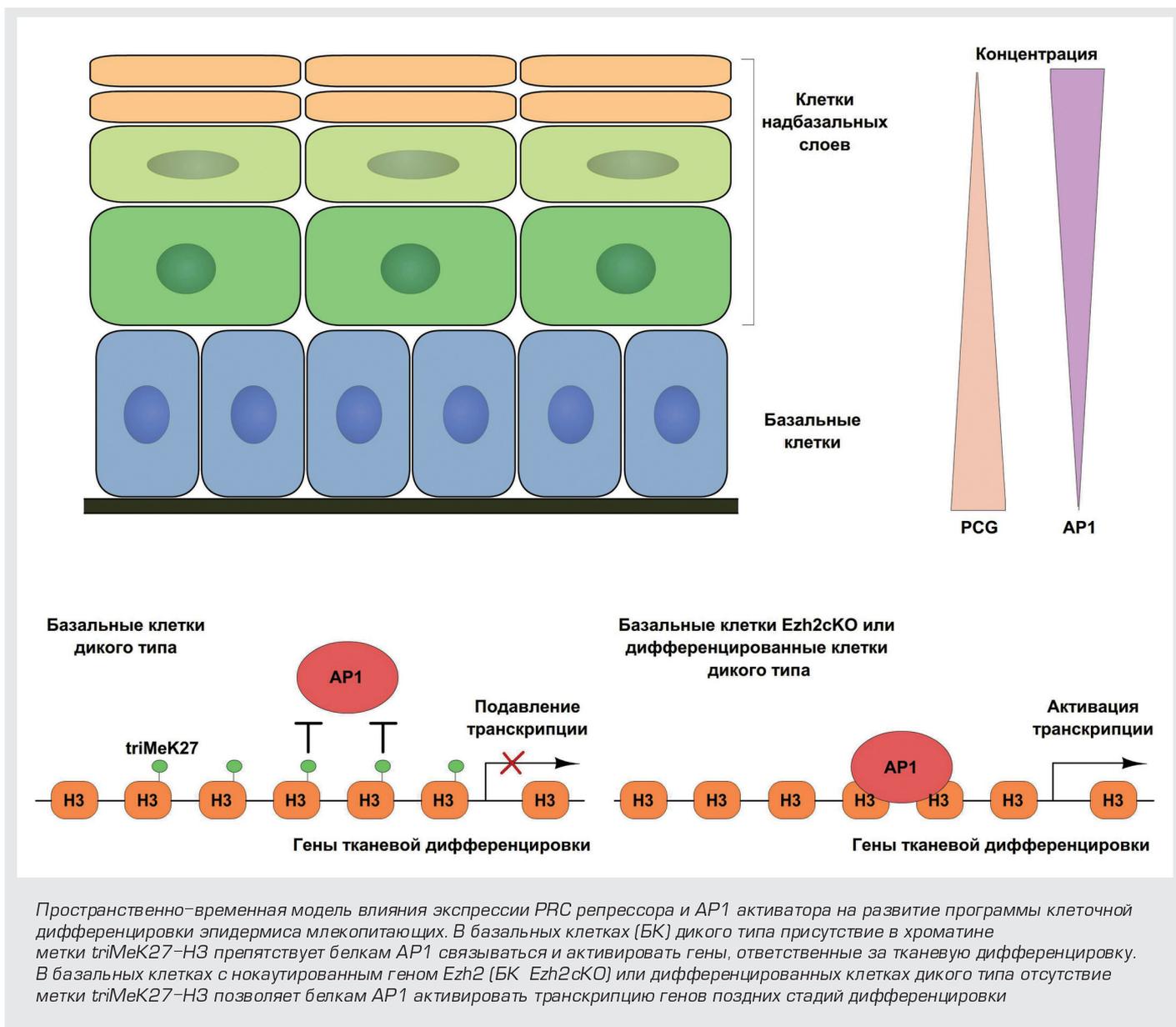
Таким образом, приведенное исследование предлагает новый механизм, описывающий PRCs-опосредованную репрессию генов тканеспецифической дифференцировки. Пространственный баланс между экспрессией эпигенетических репрессоров PRCs в недифференцированных клетках и активаторов транскрипции, таких как AP1, в специализированных клетках контролирует соответствующую работу ступенчатого механизма эпидермальной дифференцировки во время развития кожи.

Кроме того, становится понятным еще одно важное отличие в механизме контроля дифференцировки в эмбриональных стволовых клетках и клетках — эпидермальных предшественниках. В хроматине ЭСК метка triMeK27-H3 присутствует повсеместно, что ведет к глобальной репрессии ключевых транскрипционных регуляторов и способствует сохранению потенциала к основанию различных клеточных линий [4]. Такая повсеместная

репрессия у ЭСК особенно важна для сохранения их плюрипотентности. Свойством ЭСК также является сохранение способности отвечать на внешние сигналы активацией любого из путей дифференциации, подавленного белками группы polycomb. Как только такие клетки оказываются детерминированы к дифференцировке, они должны репрессировать плюрипотентные регуляторы, такие как Oct4, Nanog и Sox2 [5]. В эпидермальных стволовых клетках, напротив, поддерживается постоянная репрессия плюрипотентных регуляторов и

направленно активируется только одна программа дифференцировки, которая ведет к образованию кожного барьера.

В свете новых данных появляется объяснение наблюдений об оверэкспрессии гена Ezh2 в клетках многих опухолей. В таких клетках запущен механизм гиперпролиферации и снижены темпы тканевой дифференциации, что ведет возврату в эмбриональное состояние. В регуляции именно таких состояний клеток активное участие принимает белок Ezh2.



ЛИТЕРАТУРА:

1. Zeidler M., Kleer C.G. The Polycomb group protein Enhancer of Zeste 2: its links to DNA repair and breast cancer. *J. Mol. Biol.* 2007; 37: 219–23.
2. Viri E., Brenner C., Deplus R. et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439: 871–4.
3. Watt F.M., Lo Celso C., Silva-Vargas V. Epidermal stem cells: an

update. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006; 16: 518–24.

4. Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J. et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441: 349–53.

5. Pasini D., Bracken A.P., Hansen J.B. et al. The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27: 3769–79.

Подготовил А. Иванов  
 По материалам: Ezhkova E., Pasolli H.A., Parker J.S. et al. Ezh2 Orchestrates Gene Expression for the Stepwise Differentiation of Tissue-Specific Stem Cells. *Cell* 2009; 136: 1122–1135.

## На пути к расшифровке транскрипционной программы гемопоэтических стволовых клеток

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) давно оправдала возложенные на нее надежды и ожидания, став первым и пока единственным примером истинно успешного использования стволовых клеток в терапии. Но, несмотря на достигнутый прогресс, до сих пор не предложено эффективного способа экспансии ГСК в культуре, и поэтому количество ГСК в распоряжении исследователей и клиницистов зависит от особенностей самого донора и успеха процедуры выделения клеточного материала. Более того, хотя поверхностный фенотип ГСК хорошо описан [1], мало что известно о генетическом контроле транскрипционного профиля этих клеток. К примеру, было обнаружено, что нуклеарный фактор *Hoxb4* и его производные (*Hoха9*, *NA10HD*), по-видимому, могут способствовать экспансии ГСК [2, 3]. В отличие от ГСК, транскрипционная сеть взаимодействий в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) уже хорошо изучена. Очевидно, что венцом таких исследований стали работы по перепрограммированию дифференцированных клеток и получению плюрипотентных iPS-клеток [4].

Значительного прогресса в выяснении транскрипционной программы, отвечающей за функциональную активность ГСК, удалось достигнуть группе канадских исследователей под руководством Guy Sauvageau, результаты работы которых были опубликованы в журнале «Cell».

По аналогии с ЭСК, плюрипотентный статус которых контролируется несколькими ключевыми транскрипционными факторами (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* и др.), E. Deneault с соавт. предположили, что основные свойства ГСК (способность к самообновлению и дифференцировке) также могут зависеть от активности подобных «мастер-регуляторов». Для обнаружения этих регуляторных белков авторы сначала подготовили базу данных, куда вошли 689 нуклеарных факторов, так или иначе претендующих на роль в контроле функционального состояния ГСК (первичные данные были получены из исследований глобального профиля генной экспрессии в ГСК и лейкозных стволовых клетках). Основываясь на специфичности, выраженности и стабильности экспрессии этих генов в ГСК, были отобраны 104 гена-кандидата для дальнейшего функционального скрининга (важно, что среди выбранных генов оказались известные регуляторы кроветворения: *Egr1*, *Gata2*, *Sfp1* (PU.1), *Foxo1*, *Meis1*, *Myb*, *Hoха9* и *Runx1*).

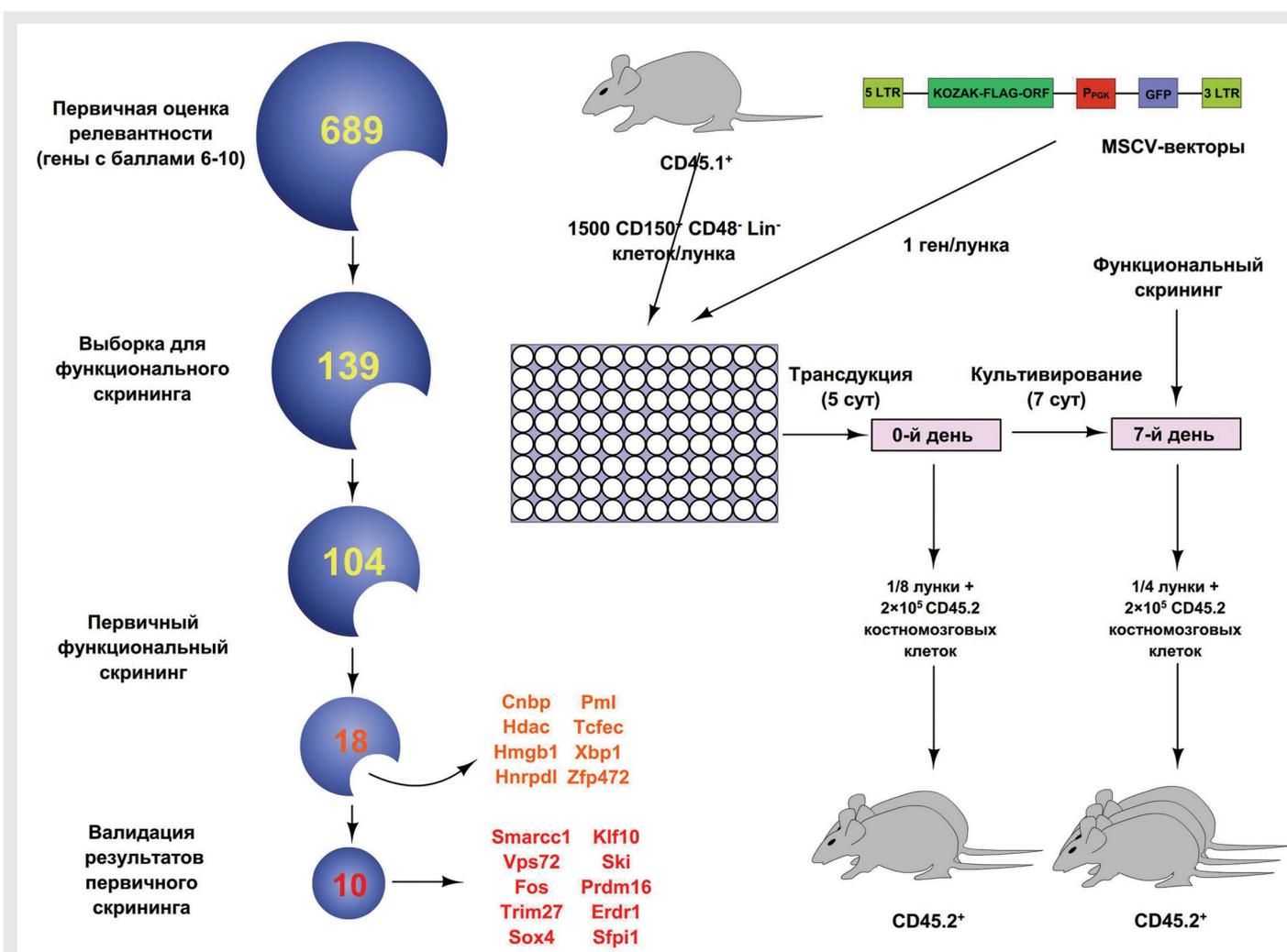
Функциональный скрининг заключался в следующем (рис.). Отсортированные ГСК (1500 клеток; фенотип  $CD150^+ CD48^- Lin^-$ ) из костного мозга  $CD45.1^+$  мышей культивировали в 96-луночной планшете совместно с клетками-продуцентами ретровирусного вектора, несущего ген одного из 104 отобранных регуляторных факторов. После инфицирования ГСК в течение пяти сут. часть клеток трансплантировали конгенным  $CD45.2^+$  мышам совместно с  $2 \times 10^5$   $CD45.2^+$  костномозговыми клетками (конкурентная трансплантация). Оставшиеся ГСК культивировали еще 7 сут., после чего проводили аналогичную трансплантацию. Затем через 4-недельные интервалы оценивался вклад донорских (т. е.  $CD45.1^+$ ) ГСК в долгосрочное восстановление гемопоэза у мыш-реципиентов (так наз. тест конкурентных репопуляционных единиц  $3/4$  — CRU assay). В качестве негативного

контроля трансплантировались ГСК, инфицированные «пустым» ретровирусным вектором.

Авторы использовали *Hoxb4* в качестве гена-прото-типа (позитивного контроля), для которого уже была известна способность усиливать функцию ГСК [5]. Так, значительное увеличение репопуляционной активности было отмечено у *Hoxb4*-инфицированных ГСК после дополнительного культивирования в течение 7 сут., что позволило на основе стандартного отклонения среднего установить нижнюю границу (cut-off) для разделения других генов-кандидатов по функциональной активности на «*Hoxb4*-подобные» гены (18 генов) и гены «с меньшим потенциалом» (оставшиеся 86). После проведения нескольких независимых экспериментов из 18-ти «*Hoxb4*-подобных» генов только десять подтвердили свою высокую (т. е. сравнимую с *Hoxb4*) функциональную активность: *Smarcc1*, *Vps72*, *Fos*, *Trim27*, *Sox4*, *Klf10*, *Ski*, *Prdm16*, *Erdr1* и *Sfp1*. Отметим, что оставшиеся восемь генов (*Cnbp*, *Hdac1*, *Hmgb1*, *Hnrpd1*, *Pml*, *Tcfec*, *Xbp1*, *Zfp472*), хотя и не вошли в конечную «десятку», тоже обладали высоким функциональным потенциалом (в сравнении с негативным контролем). E. Deneault с соавт. подтвердили, что все десять обнаруженных генов активно и специфически экспрессируются в интактных ГСК, выделенных из костного мозга и фетальной печени. Тем не менее, экспрессия этих генов в инфицированных ГСК намного превосходила естественный эндогенный уровень (от 3- до 1000-кратного).

Известно, что при культивировании выделенных ГСК значительная доля клеток теряет статус «стволовых» и начинает дифференцироваться в клетки крови (преимущественно миелоидного ряда). Авторы показали, что у ГСК, экспрессирующих *Hoxb4*-подобные гены, напротив, дифференцировка *in vitro* блокируется. В то же время, значимые изменения в пролиферативной активности и уровне клеточной гибели ГСК в культуре не были обнаружены. Ситуация изменяется после трансплантации инфицированных ГСК мышам-реципиентам. Введенные клетки успешно восстанавливали кроветворение у животных, о чем свидетельствовали морфологический и цитологический анализ костного мозга и селезенки, иммунофенотипирование донорских ( $CD45.1^+$ ) клеток и клональные тесты для тимических и костномозговых клеток. При этом экспрессия трансгенов в донорских клетках сохранялась длительное время после трансплантации (по крайней мере, до 20-й недели). Исключением стал ген *Prdm16*: ГСК, несущие *Prdm16*, не были способны к полноценной репопуляции кроветворных органов.

E. Deneault с соавт. получили свидетельства того, что по крайней мере некоторые ГСК, экспрессирующие *Hoxb4*-подобные гены, способны к самообновлению *in vitro*. Так, у разных мышей, которым трансплантировали ГСК из одной и той культуры, в кроветворных тканях были обнаружены идентичные клеточные клоны (т. е. клоны с одинаковыми сайтами провирусной интеграции). Это указывает на то, что инфицированные ГСК претерпевали симметричные деления в культуре, прежде чем были трансплантированы разным животным. Тем не менее, как отмечают сами авторы, подобного теста явно недостаточно, чтобы говорить о способности стволовых



Этапы скрининга для обнаружения нуклеарных факторов, контролирующих функциональную активность ГСК (по рис. из статьи). Из 689 факторов, вошедших в первичную базу данных, после оценки их релевантности были отобраны 104 гена для функционального скрининга. В результате скрининга исследователи выделили группу генов с *Hoxb4*-подобным уровнем активности, из которых десять подтвердили свою значимость после повторного анализа (выделены красным; оставшиеся восемь генов выделены оранжевым). Пояснения в тексте

клеток к самообновлению, и для подтверждения этого потребуется расширенный клональный анализ.

Наиболее неожиданным оказался тот факт, что в кроветворных тканях большинства мышей, которым трансплантировали ГСК, трансдуцированные генами *Fos*, *Sfp1*, *Tcfec* и *Hmgb1*, трансгены обнаружить не удалось. Это означает, что экспрессия этих генов в самих ГСК не обязательна для усиления их функциональной активности, и, внешние факторы, продуцируемые фидерными клетками, по всей видимости, ответственны за подобный эффект. Вероятно также, что чрезмерно высокая экспрессия этих генов может вызывать гибель трансдуцированных ГСК, способствуя экспансии оставшихся клеток. Чтобы проверить свои предположения, G. Sauvageau и коллеги трансдуцировали NIH 3T3 клетки, не способные к вирусной продукции, ретровирусным вектором, несущим один из четырех указанных генов. Использование этих клеток в качестве фидерных гарантировало, что репопуляционный потенциал ГСК не будет зависеть от экспрессии гена в самих ГСК, а будет контролироваться лишь внешними сигналами от фидерных клеток. Выяснилось, что оверэкспрессия трех (*Fos*, *Tcfec* и *Hmgb1*) из четырех тестируемых генов в фидерных клетках

достаточна для стимуляции репопуляционного потенциала ГСК и восстановления гемопоэза у мышей, как при использовании трансдуцированных стволовых клеток.

Работа исследовательской группы G. Sauvageau имеет первостепенную значимость как для практической медицины, так и для фундаментальной биологии. С точки зрения клинической науки, полученные результаты свидетельствуют о возможности стимуляции функциональной активности ГСК *in vitro* без генетической модификации клеток. В дальнейшем предстоит выяснить природу экзогенных факторов, продуцируемых трансдуцированными фидерными клетками, и определить функциональную значимость этих факторов для ГСК человека. Тем не менее, экспансия ГСК *in vitro* — не единственная стратегия, направленная на увеличение количества стволовых клеток в трансплантате. Новые фармакологические агенты, усиливающие мобилизацию ГСК (выход клеток из костного мозга в периферический кровоток), могут стать весомой альтернативой *in vitro* манипуляциям. Например, на роль мощного мобилизирующего средства претендует агонист TLR2 — модифицированный липопептид из *Mycoplasma*, активность которого у мышей превосходит таковую для широко используемого G-CSF [6].

Функциональный скрининг более чем ста генов, функция большинства из которых оставалась неясной, и создание общедоступной базы данных [7] стали важнейшим шагом на пути к расшифровке транскрипционной программы ГСК. Работа G. Sauvageau и коллег свидетельствует, что регуляция транскрипции в данных стволовых клетках отнюдь не проста. Вполне вероятно, что многие транскрипционные факторы, модификаторы хроматина, микроРНК и другие регуляторы вместе формируют комплексную сеть взаимодействий, зависящую от количественных и локализационных изменений отдельных компонентов. С одной стороны, такая многокомпонентная программа транскрипционной регуляции в ГСК согласуется с позицией, что фоновая экспрессия одновременно многих генов-регуляторов определяет пластичность стволовых клеток, их потенциальность к дифференцировке в различных направлениях [8]. С другой стороны, концепция «мастер»-гена (master gene) [9], т. е. ключевого регуляторного (как правило, транскрипционного) фактора, отвечающего за дифференцировку клетки в конкретный клеточный тип, за 20 лет своего существования нашла широкую поддержку среди биологов и легла в основу технологии индуцированного перепрограммирования зрелых клеток [10, 11]. Однако на сегодняшний день правило «один (или несколько) мастер-генов — один клеточный тип» требует преобразования. Недавние исследования продемонстрировали, что

многие дифференцированные клетки, в частности, Т-лимфоциты, намного пластичнее, нежели думали ранее. Например, популяция CD4<sup>+</sup> Т-клеток, развитие которых, казалось, идеально соответствовало концепции мастер-гена (дифференцировочная программа Th1-, Th2-, Th17- и регуляторные Т-клеток контролируется, соответственно, транскрипционными факторами T-bet, GATA3, RORγt и FoxP3), как оказалось, экспрессируют либо способны экспрессировать ключевые гены «чужой» линии дифференцировки [12, 13].

Объяснения вышеупомянутых результатов, в том числе E. Deneault с соавт., по-видимому, следует искать в работах системных биологов, которые рассматривают «популяции» и «типы» клеток как динамические состояния (аттракторы) с различной степенью устойчивости [14]. Каждая клетка под влиянием внешних сигналов непрерывно изменяет свой транскрипционный профиль, «передвигаясь» по фазовому пространству внутри и между зонами притяжения. В этом случае за удержание клетки внутри определенного аттрактора (а значит, принадлежность клетки какой-то «популяции») зависит от уровня экспрессии и активности сразу многих взаимодействующих транскрипционных регуляторов. Хочется верить, что расшифровка этих сложных регуляторных сетей и количественная оценка транскрипционных изменений на системном уровне откроет путь в самое «сердце» динамичной физиологии клетки и к новым подходам в терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Weissman I.L., Shizuru J.A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 2008; 112(9): 3543–53.
2. Ohta H., Sekulovic S., Bakovic S. et al. Near-maximal expansions of hematopoietic stem cells in culture using NUP98-HOX fusions. *Exp. Hematol.* 2007; 35(5): 817–30.
3. Thorsteinsdottir U., Mamo A., Kroon E. et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 2002; 99(1): 121–9.
4. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008; 132(4): 567–82.
5. Antonchuk J., Sauvageau G., Humphries R.K. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 2002; 109(1): 39–45.
6. А. В. Гудков, <http://www.dsls.usra.edu/meetings/radiation2007/>
7. The Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal Resource, Institute for

Research in Immunology and Cancer: <http://www.bioinfo.irc.ca/self-renewal/>  
8. Zepori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5(11): 873–8.

9. Weintraub H., Tapscott S.J., Davis R.L. et al. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *PNAS* 1989; 86(14): 5434–8.

10. Takeuchi J.K., Bruneau B.G. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 2009; 459(7247): 708–11.

11. Zhou Q., Brown J., Kanarek A. et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627–632.

12. Lee Y.K., Mukasa R., Hatton R.D., Weaver C.T. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21(3): 274–280.

13. Wei G., Wei L., Zhu J., Zang C., Hu-Li J. et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 2009; 30(1): 155–167.

14. Enver T., Pera M., Peterson C., Andrews P.W. Stem cell states, fates, and the rules of attraction. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 387–397.

Подготовил А.А. Леляевский

По материалам: Deneault E., Cellot S., Faubert A. et al. A functional screen to identify novel effectors of hematopoietic stem cell activity. *Cell* 2009; 137(2): 369–79.

## Адиipoциты костного мозга являются ингибиторами гемopoэтического микроокружения

Кроветворные (гемopoэтические) стволовые клетки (ГСК) являются мультипотентными стволовыми клетками, способными к самообновлению и дифференцировке во все типы клеток крови. ГСК находятся главным образом в костном мозге взрослого человека. Различают два типа костного мозга: красный костный мозг, состоящий из стромы и ГСК/клеток-предшественниц, и желтый костный мозг, в котором преобладает жировая ткань. При рождении преобладает красный костный мозг, но с возрастом происходит его замещение на желтый. Ранее считалось, что подобное замещение красного костного мозга является механическим заполнением освобождающегося пространства в костномозговых полостях. Однако в своей работе O. Naveiras с соавт. (лаборатория Джоржа Дейли) показали, что адиipoциты играют активную роль в регуляции гемopoэтической активности костного мозга.

Для начала авторы провели исследование по изучению активности ГСК в различных костях мышей. В качестве модели костного мозга с повышенным содержанием адиipoцитов были выбраны хвостовые позвонки (на уровне 3–4 позвонков). Костный мозг грудных позвонков мышей практически не содержит адиipoцитов и состоит в основном из красного костного мозга. Исследователи провели выделение ГСК из хвостовых и грудных позвонков 12-недельных мышей с последующим их фенотипическим и функциональным анализом. При этом было установлено, что костный мозг хвостовых позвонков по сравнению с костным мозгом грудных позвонков содержал только 25% CD45<sup>+</sup> клеток. Доля всех классов CD45<sup>+</sup> гемopoэтических клеток-предшественниц (мультипотентных предшественников, общих миелоидных предшественников, мегакариоцитных-эритроидных предшественников) была в 2–3 раза ниже в популяции клеток костного мозга хвостовых позвонков по сравнению с красным костным мозгом грудных позвонков. Клоногенный анализ также показал более низкое (в 1,5–3 раза) содержание различных классов предшественников в костном мозге хвостовых позвонков мышей. В серии контрольных экспериментов авторы показали, что полученные данные не связаны с возрастом животных или с характером физической нагрузки исследуемых костей. Таким образом, авторами дается заключение, что костный мозг хвостовых позвонков мышей обладает пониженным содержанием ГСК как в абсолютных количествах, так и в процентном отношении.

Для объяснения низкой гемopoэтической активности костного мозга хвостовых позвонков было важно определить характер репликации ГСК для ответа на вопрос, находятся ли ГСК из хвостовых позвонков на стадиях медленной репликации или на стадии клеточного старения (senescence).

Клеточное старение представляет собой механизм, который вначале был описан для клеток, культивируемых *in vitro*. При достижении определенного числа делений клетка перестает делиться и, в конце концов, умирает (так называемый предел или лимит Хейфлика, англ. Hayflick limit). Это связано с сокращением длины теломера и накоплением различных клеточных повреждений. Зачастую, без использования специальных под-

ходов, трудно определить репликационный статус клетки на основании ее морфологии или динамики клеточного деления. В культуре клеток мы обычно наблюдаем быстрое деление стволовых клеток, в то время как в своем естественном микроокружении в организме большинство клеток находится на стадии медленной репликации, при которой клеточное деление происходит редко, однако при этом стволовая клетка остается полностью функциональной и готовой к делению при поступлении определенных сигналов из окружающей среды.

Была проведена клеточная сортировка ГСК и их трансплантация мышам, подвергшимся летальным дозам облучения. Было показано, что степень репопуляционной активности ГСК из хвостовых и грудных позвонков существенно не различалась. Однако была отмечена более высокая долговременная приживаемость клеток крови всех типов после трансплантации ГСК из костного мозга хвостовых позвонков. Это свидетельствует о том, что ГСК в костном мозге хвостовых позвонков, по-видимому, находятся на стадии репликационного покоя, а не на стадии клеточного старения.

Полученные данные говорят о взаимосвязи количества адиipoцитов и гемopoэтической активности стволовых клеток костного мозга. Однако, они не позволяют сделать вывод о влиянии адиipoцитов на гемopoэз. Известно, что костная ткань играет важную роль в формировании гемopoэтической ниши [1]. Низкая интенсивность остеогенеза в хвостовых позвонках ввиду отсутствия физической скелетной нагрузки может быть одним из факторов, объясняющим низкий уровень гемopoэза в данной нише. Для ответа на этот вопрос авторы обратились к липоатрофийной модели на основе трансгенных «безжирных» (англ. «fatless») мышей A-ZIP/F1 [2]. Эти трансгенные мыши не могут образовывать адиipoциты из-за экспрессии доминантно-негативной аллели гена C/EBP под контролем промотора адиipoцитарного белка, связывающего жирные кислоты 4 (англ. adipocyte fatty-acid-binding protein, Fabp4). В отличие от мышей дикого типа, у трансгенных наблюдался эффективный гемopoэз в костном мозге хвостовых позвонков, подобный гемopoэзу в грудных позвонках. Данное наблюдение подтверждает гипотезу, что низкая интенсивность остеогенеза в хвостовых позвонках, связанная с отсутствием физической нагрузки на кость, не связана с пониженной интенсивностью гемopoэза в костном мозге данного отдела позвоночника. Таким образом, можно сделать вывод, что присутствие адиipoцитов напрямую связано с более низкой гемopoэтической активностью в костном мозге различных отделов скелета.

Далее было определено влияние адиipoцитов на восстановление гемopoэза после трансплантации костного мозга. В период от 2 до 4 нед. после летальной дозы облучения объем костного мозга во всех костях мыши замещался тканью с повышенным содержанием адиipoцитов (желтым костным мозгом). Во время посттрансплантационного периода реабилитация организма (как мыши, так и человека) зависит от быстро делящихся краткосрочных гемopoэтических клеток-предшественниц, которые участвуют в коррекции панцитопении [3]. После летальной дозы лучевой терапии мышам дикого

типа или A-ZIP/F1 трансгенным мышам (из одного помета) была проведена трансплантация костного мозга необлученных мышей дикого типа. Как и ожидалось, облучение трансгенных мышей сопровождалось значительным снижением образования адипоцитов в костном мозге по сравнению с контролем. Уровень лейкоцитов в A-ZIP/F1 мышах превышал в 4 раза уровень лейкоцитов в контрольных мышах. Также было отмечено значительное ускорение восстановления содержания гемоглобина в периферической крови у липоатрофичных трансгенных мышей. Важно отметить, что как контрольные, так и трансгенные мыши показали высокую степень продолжительного донорского химеризма после первичной трансплантации. Таким образом, было показано, что отсутствие адипогенеза в A-ZIP/F1 мышах увеличивает восстановление гемопоэза в результате повышения эффективности трансплантации краткосрочных клеток-предшественниц.

В ходе экспериментов было замечено, что абляция костного мозга облучением в A-ZIP/F1 мышах сопровождалась значительным увеличением активности остеогенеза. Плотность губчатого вещества в бедренной кости значительно увеличивалась у трансгенных мышей по сравнению с контрольными мышами дикого типа на 20 день после летальной абляции. Исследователи показали, что одновременная абляция ГСК и адипоцитов костного мозга может индуцировать остеогенез, что, согласно литературным данным, может приводить к формированию более благоприятного микроокружения для гемопоэтического восстановления [4, 5]. Подобный эффект стимуляции остеогенеза и роста губчатой кости наблюдался и в экспериментах по хирургическому удалению костного мозга из бедренной кости кроликов [6]. Предотвращение формирования адипоцитов в костном мозге не вызывает остеогенез напрямую. Только одновременная абляция адипоцитарного и гемопоэтического компонентов приводит к остеогенезу в области костного мозга, что свидетельствует о трехсторонней регуляции ниши костного мозга.

Ингибирование адипогенеза фармакологическими препаратами также приводило к повышению эффективности трансплантации костного мозга мышам дикого типа. Известно, что ингибитор рецептора активируемого пролифератором пероксисом-с (англ. peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ , PPAR- $\alpha$ ) диглициловый эфир бисфенола А (англ. bisphenol A diglycidyl ether, BADGE) предотвращает формирование адипоцитов *in vivo* и *in vitro* на модели стрептозотоцин-индуцированного (англ. streptozotocin-induced) диабета [7]. При этом

BADGE не влияет на гемопоэтическое формирование колоний *in vitro*, когда клетки костного мозга находятся вне контекста стромального микроокружения. Введение BADGE мышам, подвергшимся летальным дозам лучевой терапии, на протяжении 2 недель после трансплантации костного мозга приводило к ингибированию адипогенеза, повышению уровня лейкоцитов в периферической крови и увеличению колониеобразующих единиц. Таким образом, было показано, что влияние адипоцитов на эффективность трансплантации гемопоэтических клеток может быть снижено фармакологически.

Авторы опровергают классическую теорию пассивной роли адипоцитов в качестве заполнителей костномозговых полостей. Анализ ГСК из разных типов костного мозга, а также эксперименты по трансплантации ГСК клеток мышам, не способным эффективно формировать адипоциты в костном мозге в результате генетического или фармакологического вмешательства, показали, что адипоциты отрицательно влияют на популяцию гемопоэтических клеток-предшественниц, снижая их количественные показатели и репликационную активность. Исследование открывает перспективы фармакологического повышения эффективности трансплантации ГСК (например, из костного мозга, пуповинной или периферической крови). Механизм подобного ингибирования возможно связан с секрецией адипоцитами костного мозга различных факторов, которые ингибируют гемопоэз. Адипоциты и остеобласты являются потомками мезенхимальных стволовых клеток (англ. mesenchymal stem cells, MSC) костного мозга. Костное и жировое микроокружение находятся в реципрокном взаимодействии. Остеобласты выступают в роли индукторов гемопоэза, в то время как адипоциты являются ингибиторами гемопоэза.

В заключение стоит отметить, что гемопоэз у грызунов и человека происходит в различных местах. У мышей кроветворение происходит во всех костях и селезенке в течение всей жизни животного. У человека же кроветворение ограничено эпифизами длинных трубчатых костей, костями черепа и таза, позвоночником, ребрами, грудиной и подвздошной костью. Несмотря на то, что вышеописанные исследования были проведены на мышиной модели и неизвестно, насколько полученные данные могут быть применены к человеку, на настоящий момент модель на основе малых лабораторных животных является лучшей из имеющихся для изучения гемопоэза и позволяет проводить сложные эксперименты *in vivo*, которые невозможно проводить на людях.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Askmyr M., Sims N., Martin J., Purton L. What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? *Trends Endocrinol. Metab.*, on-line publ. 13 July 2009.
2. Moitra J., Mason M., Olive M. et al. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* 1998; 12(20): 3168–81.
3. Yang L., Bryder D., Adolfsson J. et al. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 2005; 105(7): 2717–23.
4. Calvi L., Adams G., Weibrecht K. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425(6960): 841–6.

5. 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): 836–41.
6. Tavassoli M., Maniatis A., Crosby W. Induction of sustained hemopoiesis in fatty marrow. *Blood* 1974; 43(1): 33–8.
7. Botolin S., McCabe L. Inhibition of PPAR $\gamma$  prevents type I diabetic bone marrow adiposity but not bone loss. *J. Cell Physiol.* 2006; 209(3): 967–76.
8. Furuhashi M., Tuncman G., Gurgun C. et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 2007; 447(7147): 959–65.

Подготовил А. Ризванов

По материалам: Naveiras O., Nardi V., Wenzel P.L. et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 2009; 460(7252): 259–63.

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

### Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и генная терапия в лечении пациентов, инфицированных ВИЧ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) проникает в Т-хелперы, связываясь сначала с рецептором CD4, а затем с одним из хемокиновых рецепторов, CCR5 либо CXCR4. Люди, гомозиготные по аллели с делецией 32-bp (так называемая делеция delta32/delta32) гена CCR5, имеют рецептор CCR5 с нарушенной конформацией и обладают естественной резистентностью к инфицированию ВИЧ-1 [1]. Логично предположить, что трансплантация гемопоэтических клеток с delta32/delta32-генотипом пациенту, инфицированному ВИЧ, способна привести если не к полному излечению, то, по крайней мере, к стойкому восстановлению иммунного статуса за счет появления в организме невосприимчивых к ВИЧ Т-лимфоцитов. Тем не менее, подобных трансплантаций до настоящего времени практически не проводилось [2], а трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пациентам с ВИЧ без учета генотипа рецептора CCR5 не приводили к изменению состояния больных [3]. Недавно в журнале *The New England Journal of Medicine* было опубликовано сообщение группы G. Huetter об аналогичной трансплантации ГСК, с аллелями delta32/delta32, пациенту с ВИЧ.

Помимо ВИЧ у 40-летнего пациента был диагностирован острый миелобластный лейкоз (ОМЛ). Пациент проходил курс HAART-терапии (highly active antiretroviral therapy), которая включает сильнодействующие противовирусные препараты и зачастую имеет серьезные побочные эффекты [4], а также со временем может приводить к развитию у вируса лекарственной устойчивости. На фоне противовирусной терапии РНК ВИЧ в периферической крови пациента не обнаруживалась, однако в связи с токсическими эффектами химиотерапии протокол HAART пришлось приостановить, в результате чего содержание РНК вируса в крови возросло до  $6,9 \times 10^6$  копий/мл.

После курса миелоаблативной химиотерапии пациенту была проведена трансплантация CD34<sup>+</sup> клеток от неродственного HLA-совместимого донора, гомозиготного по аллели гена CCR5 delta32/delta32. Количество трансфузированных ГСК составило  $2,3 \times 10^6$  клеток/кг [5]. Через 13 сут. у пациента было отмечено приживание трансплантата и восстановление показателей крови до нормы. Однако спустя 11 мес. был диагностирован рецидив ОМЛ, и количество донорских клеток в крови снизилось до 15%. После этого был проведен повторный курс химиотерапии и радиотерапии с миелоаблацией, а также трансплантация ГСК от того же донора. Количество клеток составило  $2,1 \times 10^6$  клеток/кг. Вторая процедура привела к ремиссии, которая продолжалась в течение 20 мес.

После трансплантации в периферической крови пациента перестали определяться антитела к полимеразе и к белкам капсида ВИЧ-1, хотя антитела к вирусным

гликопротеинам gp120 и гликопротеинам gp41 продолжали выявляться. Тем не менее, исследование с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) не выявило в крови РНК ВИЧ-1. Клиницисты также исследовали биоптаты слизистой оболочки прямой кишки больного, полученные на 5 мес. после трансфузии. CD4<sup>+</sup> лимфоциты слизистой оболочки кишечника несли на плазмалемме дефектный рецептор CCR5, не способный связывать вирус. Нормальный рецептор CCR5 сохранялся на макрофагах, однако, следует заметить, что некоторые макрофаги являются долгоживущими клетками, которые могут оставаться резервуаром инфекции в течение длительного времени.

Авторы работы не выявили ухудшения состояния пациента в течение всего срока наблюдения, а также появления в организме детектируемой РНК вируса. Это более чем обнадеживающий результат, однако, приходится констатировать, что практика подобных трансплантаций вряд ли может стать рутинным клиническим методом. Подбор HLA-совместимого донора сам по себе – сложная процедура, которая в данном случае дополнительно усложняется поиском донора, гомозиготного по аллели гена CCR5 delta32/delta32. Авторы работы указывают, что из 62 совместимых доноров, зарегистрированных в Немецком Центре Доноров Костного Мозга (German Bone Marrow Donor Center), только один оказался носителем искомой мутации. Помимо этого, сам вирус иммунодефицита не всегда использует для проникновения в клетку рецептор CCR5, и существует менее часто встречающийся тип вируса (X4), использующий в качестве корецептора молекулу CXCR4. Более того, обычно в крови пациентов с ВИЧ обнаруживаются одновременно разные штаммы вирусов [6]. В данном случае у пациента в сыворотке крови были выявлены следовые количества РНК ВИЧ-1 типа X4, однако они, по-видимому, не повлияли на исход лечения, и пациент смог отказаться от высокотоксичной HAART-терапии.

Помимо единичных попыток трансплантации ГСК с целью восстановления нормального лимфопоэза, в настоящее время проводятся полноценные клинические исследования, основанные на том же принципе – создание в организме пациента пула невосприимчивых к ВИЧ-1 Т-лимфоцитов.

Практически одновременно с результатами описанного клинического случая в журнале *Nature Medicine* были опубликованы результаты второй фазы клинических испытаний трансплантации генетически модифицированных аутогенных ГСК пациентам с ВИЧ. Данная работа была проведена группой R.T. Mitsuyasu и является первым рандомизированным, двойным слепым, плацебо-контролируемым клиническим исследованием, в которое были включены 74 пациента (38 пациентов в исследуемой и 36 пациентов в контрольной группах).

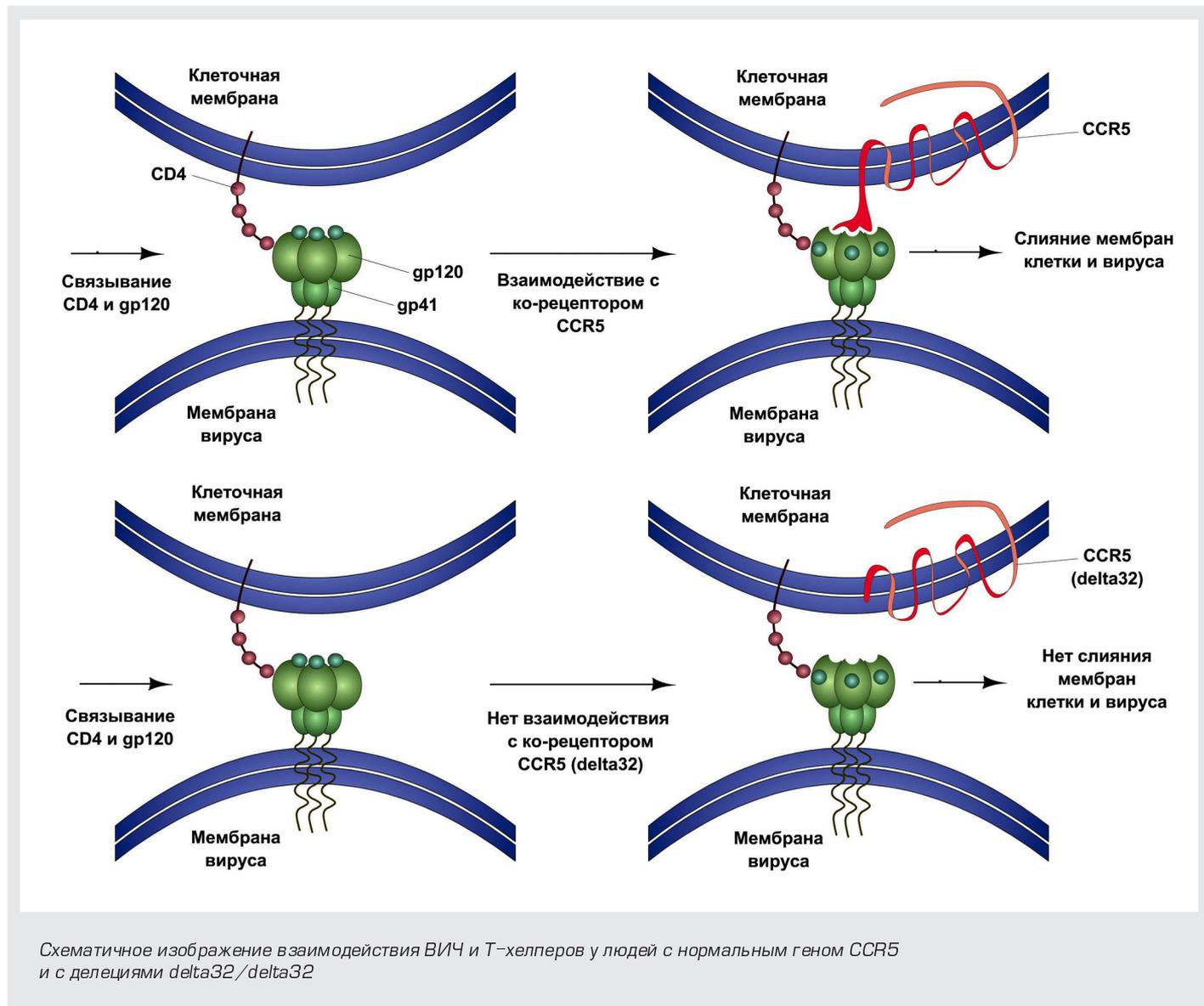
У пациентов из исследуемой группы после курса терапии HAART была проведена мобилизация ГСК из костного мозга, после чего CD34<sup>+</sup> клетки были собраны из периферической крови и трансдуцированы геном рибозима OZ1, специфически расщепляющего РНК ВИЧ. После было выполнено обратное введение клеток в кровоток. Пациенты из контрольной группы получили трансфузию аутогенных CD34<sup>+</sup> клеток, не трансдуцированных геном рибозима.

Ранее в нескольких исследованиях было показано, что OZ1 ингибирует репликацию ВИЧ-1 *in vitro*, причем при длительном культивировании у вируса не развивается резистентность к его действию [7-10]. В двух клинических испытаниях I фазы было продемонстрировано, что трансплантация аутогенных ГСК либо CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, трансдуцированных геном OZ1, является безопасной процедурой [11, 12]. После трансплантации у пациентов не наблюдалось негативных побочных эффектов как в раннем, так и в позднем посттрансплантационном периоде. Авторы клинического исследования предположили, что собственные ГСК, трансдуцированные геном OZ1, дадут начало популяциям миелоидных

и лимфоидных клеток, в которых вирус не сможет реплицироваться [8].

Доля CD34<sup>+</sup> клеток, трансдуцированных геном OZ1, составляла 54% от общего количества трансплантированных пациентам из исследуемой группы ГСК. После трансплантации пациентов наблюдали в течение 46 мес., оценивая присутствие в их периферической крови провирусной ДНК ВИЧ, активной РНК-формы рибозима OZ1, абсолютное количество CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в крови, а также функцию тимуса (TREC-анализ).

Спустя 1 мес. после трансплантации у 94% пациентов исследуемой группы в крови обнаруживалась ДНК OZ1, однако со временем этот показатель сильно снижался (до 7% через 3 мес.). Через 1,5 мес. у этих пациентов отмечалось статистически недостоверное снижение титра вируса в крови в сравнении с пациентами из контрольной группы. Также была отмечена слабая корреляция между снижением количества РНК-копий ВИЧ-1 в крови и дозой трансплантированных клеток, и, хотя данные оказались статистически недостоверны, подобной корреляции в контрольной группе отмечено не было.



На 3 мес. наблюдения различия между контрольной и исследуемой группами стали статистически значимыми. У пациентов, получивших инфузию OZ1-трансдуцированных клеток, количество РНК-копий вируса в крови было существенно меньше, чем у пациентов, получивших инфузию нетрансдуцированных ГСК. После трансплантации к 3-му мес. 45% пациентов (17 человек) из исследуемой группы были вынуждены возобновить терапию HAART, однако в контрольной группе этот показатель оказался выше — 61% (22 человека). Пациенты из исследуемой группы вернулись к приему противоретровирусных препаратов позже, чем в контрольной группе — через 15 мес., в отличие от пациентов контрольной группы — примерно через 7,5 мес. Абсолютное количество CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в мкл крови у пациентов из OZ1-группы было к 3 мес. также выше, чем у пациентов из группы контроля и составило 490 и 441 клеток соответственно (у здорового человека этот показатель составляет от 500 до 1600 клеток в мкл).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Liu R., Paxton W.A., Choe S. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiplyexposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86: 367–77.
2. Ayash L.J., Ratanatharathorn V., Braun T. et al. Unrelated donor bone marrow transplantation using a chemotherapy-only preparative regimen for adults with high-risk acute myelogenous leukemia. *Am. J. Hematol.* 2007; 82: 6–14.
3. Huzicka I. Could bone marrow transplantation cure AIDS? *Med. Hypotheses* 1999; 52: 247–57.
4. Taylor B.S., Sobieszczyk M.E., McCutchan F.E., Hammer S.M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 1590–602.
5. Schmid C., Weisser M., Ledderose G. et al. Doserduced conditioning before allogeneic stem cell transplantation: principles, clinical protocols and preliminary results. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2002; 127: 2186–92.
6. Skrabal K., Low A.J., Dong W. et al. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J.*

Более чем скромные результаты, возможно, были связаны с тем, что перед трансплантацией пациентам не была проведена миелоаблативная химиотерапия, и в результате в организме постоянно присутствовали клетки, служившие резервуаром инфекции. При этом не происходило замещение инфицированных клеток OZ1-продуцирующими, поскольку ГСК, не экспрессирующие OZ1, оставались в костном мозге, и их процент, в сравнении с долей трансдуцированных ГСК, оставался значительно более высоким. В то же время о применении химиотерапии на фоне противоретровирусной терапии говорить сложно, поскольку это может повлечь за собой тяжелые побочные эффекты, угрожающие жизни пациента. Тем не менее, данное клиническое исследование показывает перспективность применения генной терапии для лечения пациентов с ВИЧ, а его результаты указывают на необходимость совершенствования данного метода, что также подтверждается уникальным результатом, о которых сообщает группа G. Huetter.

7. Fanning G., Amado R., Symonds G. Gene therapy for HIV/AIDS: the potential for a new therapeutic regimen. *J. Gene Med.* 2003; 5: 645–53.
8. Macpherson J.L., Ely J.A., Sun L.Q., Symonds G.P. Ribozymes in gene therapy of HIV-1. *Front. Biosci.* 1999; 4: D497–D505.
9. Sun L.Q., Wang L., Gerlach W.L., Symonds G. Target sequence-specific inhibition of HIV-1 replication by ribozymes directed to tat RNA. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23: 2909–13.
10. Wang L., Witherington C., King A. et al. Preclinical characterization of an anti-tat ribozyme for therapeutic application. *Hum. Gene Ther.* 1998; 9: 1283–91.
11. Macpherson J.L., Boyd M.P., Arndt A.J. et al. Long-term survival and concomitant gene expression of ribozyme-transduced CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in HIV-infected patients. *J. Gene Med.* 2005; 7: 552–64.
12. Amado R.G., Mitsuyasu R.T., Rosenblatt J.D. et al. Anti-human immunodeficiency virus hematopoietic progenitor cell-delivered ribozyme in a phase I study: myeloid and lymphoid reconstitution in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15: 251–62.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Huetter G., Nowak D., Mossner M. et al. Long-term control of HIV by CCR5 delta32/delta32 stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2009; 360: 692–8.  
Mitsuyasu R.T., Merigan T.C., Carr A. et al. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34 cells. *Nature Medicine* 2009; 15: 285–292.

## Новый подход в формировании доступа к кровеносному руслу при гемодиализе

Паллиативное лечение пациентов с декомпенсированной острой или хронической почечной недостаточностью, особенно осложненной энцефалопатией, перикардитом и полинейропатией, включает гемодиализ — метод выведения токсических веществ из организма и коррекции водно-электролитного и кислотно-основного равновесия, основанный на ультрафильтрации крови [1]. Для его проведения необходимым является стабильный доступ к сосудистому руслу, пригодный для еженедельного многолетнего использования, что определяет, во многом, успешность процедуры гемодиализа [2]. В качестве доступов к сосудам верхней или нижней конечностей применяются артериовенозные фистулы или анастомозы, соединяющие близлежащие артерию и вену и в виде

петли укладываемые подкожно. В качестве анастомозов используют как аутоанастомозы сосудов, так и стенты из искусственных материалов (например, политетрафторэтиленовые трубки [1]). В послеоперационном периоде происходит так называемое «созревание» доступа, которое включает сращение сосудистых швов и аневризмозоподобное расширение вены в области фистулы (через 3–6 мес. после операции) или трансплантированного анастомоза (1–1,5 мес.). В это время показано выполнение гемодиализа через катетеры, использование которых на постоянной основе невозможно в виду недостаточного диаметра и частых осложнений (тромбозы, кровотечения). Широкий диаметр доступа к сосудистому руслу обеспечивает адекватную скорость

кровотока (около 300 мл/мин) при подключении диализатора.

Приблизительно в 30% случаев возникают осложнения (тромбозы, инфицирование, кровотечения), препятствующие «созреванию» доступа после наложения артериовенозной фистулы, что ограничивает их применение, в противоположность использованию стентов, в ходе приживления которых осложнения наблюдаются реже [3]. Однако полностью сформированный доступ на основе артериовенозной фистулы характеризуется более продолжительным и стабильным функционированием (в среднем до 5 лет; стенты пригодны для использования 1–2 года), требуя в четыре раза меньшего количества вмешательств, направленных на предотвращение его утраты (ангиопластика, тромбэктомия, хирургическая ревизия) [4, 5].

В связи с тем, что применяющиеся в настоящее время доступы для гемодиализа отличаются длительным и часто неудовлетворительным формированием, связанным с осложнениями во время «созревания», а также относительной кратковременностью использования, разрабатываются новые подходы для обеспечения адекватного и долгосрочного доступа. Одним из перспективных направлений является создание графтов — прототипов сосудов, пригодных для использования в качестве артериовенозных шунтов.

Первые работы, направленные на создание графтов сосудов, связаны с трудами E. Bell [6] и T. Shin'oka [7] с соавт., однако объекты их исследований существенно уступали нативным сосудам по механическим характеристикам, что предопределило невозможность использования в практике сердечно-сосудистой хирургии у взрослых пациентов.

В этой связи значительный интерес представляет клиническое исследование T.N. McAllister с соавт. (2009), направленное на оценку эффективности применения созданного *in vitro* сосудистого графта в качестве артериовенозного шунта как доступа к кровеносному руслу для гемодиализа. Получив обнадеживающие результаты в эксперименте, проведенном на крысах, собаках и приматах (оценка механических свойств, безопасности, приживляемости) [8], авторы выполнили клиническое исследование, в котором приняли участие 10 человек. Каждому из них выполнялась биопсия кожи для получения фибробластов, а также из подкожных вен выделялись эндотелиоциты. Фибробласты 3–5 пассажей переносились на покрытую желатином поверхность флаконов и культивировались в среде DMEM, содержа-

щей 20% питательную среду Ham's F12, 20% фетальную бычью сыворотку, глутамин, аскорбат натрия и антибиотики. Полученные «клеточные листы» оборачивались вокруг стальных мандренов (диаметром 4,8 мм) до сопоставления противоположных сторон и культивировались в течение 10 нед. после чего мандрены извлекались, внутренний слой трубок девитализировался высушиванием на воздухе и заселялся эндотелиальными клетками.

Пациентам, уже проходящим гемодиализ через постоянный или полупостоянный доступ, выполнялось оперативное вмешательство, в ходе которого графтами анастомозировались плечевая артерия и подмышечная вена. Использование трансплантата для выполнения гемодиализа начиналось максимально отсрочено — только после появления осложнений, касающихся традиционного доступа. Контроль функционирования графта осуществлялся посредством доплеровского ультразвукового исследования и КТ-ангиографии.

Один пациент выбыл из исследования еще на подготовительном этапе из-за обнаруженных противопоказаний. Еще один умер через 4 нед. после трансплантации от несвязанных с исследованием причин. У пяти пациентов из оставшихся восьми к 6 мес. постоперационного периода сохранился адекватно функционирующий доступ, при этом у трех из них трансплантат работал в сумме более года, что приблизительно соответствует использованию стента, как доступа к сосудистому руслу, но при этом существенно уступает функционированию артериовенозной фистулы (до 5 лет). Во всех случаях с положительным результатом использование искусственного анастомоза начиналось в среднем с 4,5 мес. Несостоятельность шунта у трех пациентов была связана с появлением аневризмы, реакцией отторжения и тромбозом, что потребовало замены на стент из политетрафлуорэтилена.

Таким образом, активно разрабатываются новые подходы в плане совершенствования сосудистого доступа для гемодиализа. Однако на современном этапе созданные *in vitro* графты отличаются нестабильностью результатов использования, длительными сроками формирования (их создание, как отмечают исследователи, занимало в целом около 7,5 мес., не считая времени приживления *in vivo*) и меньшей продолжительностью использования, по сравнению со стентами и артериовенозными фистулами, что, возможно, связано с недостаточностью механических свойств графтов и недоработкой методов ведения в периоде выполнения гемодиализа.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Huber T.S., Buhler A.G., Seeger J.M. Evidence-based data for the hemodialysis access surgeon. *Semin. Dial.* 2004; 3: 217–23.
2. Besarab A. Access monitoring is worthwhile and valuable. *Blood Purif.* 2006; 24: 77–84.
3. Allon M., Robbin M.L. Increasing arteriovenous fistulas in hemodialysis patients: problems and solutions. *Kidney* 2002; 62(4): 1109–24.
4. Allon M. Current Management of Vascular Access. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 2: 786–800.
5. Rocco M.V., Bleyer A.J., Burkart J.M. Utilization of inpatient and outpatient resources for the management of hemodialysis access

complications. *Am. J. Kidney. Dis.* 1996; 28: 250–6.

6. Weinberg C.B., Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986; 231:397–400.

7. Shin'oka T., Imai Y., Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 532–33.

8. L'Heureux N., Dusserre N., Konig G. et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat. Med.* 2006; 12: 361–5.

9. McAllister T.N., Maruszewski M., Garrido S.A. et al. E-ectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet* 2009; 373: 1440–6.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: McAllister T.N., Maruszewski M., Garrido S.A. et al. E-ectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet* 2009; 373: 1440–6.