

НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Трансплантация нейронов, полученных из репрограммированных фибробластов

В связи с тем, что стационарные клеточные популяции (нейроны, кардиомиоциты) не имеют камбиальных резервов для осуществления процессов репаративной регенерации, исследуется возможность лечения пациентов с патологией ЦНС или миокарда посредством клеточной терапии [1–4]. При этом основная проблема заключается в получении иммуносовместимых клеток, способных к дифференцировке в соответствующих направлениях. Перспективным решением является использование репрограммированных аутогенных клеток, сходных с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) [5, 6].

В общем виде одной из методик репрограммирования является трансдукция вирусных транскрипционных факторов в геном клетки-реципиента, активация их и последующая селекция клеток, экспрессирующих основные гены ЭСК, ответственные за самообновление и плюрипотентность – Nanog и Oct4. В методике для индукции репрограммирования одними из первых были предложены и используются многими исследователями четыре фактора: Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 [5, 7]. Однако некоторые авторы применяют ретровирусные векторы с иным набором генов, в частности, заменяя опасный в онкогенном отношении c-Myc [8] на Nanog [9].

Во многих работах, касающихся репрограммирования, авторы в качестве обоснования сходства ЭСК и полученных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPS cells) применяют методики, позволяющие дифференцироваться клеткам исследуемой культуры в кардиомиоциты и нейроны [6, 9]. Логическим продолжением этого этапа исследования являлось бы применение методики индукции дифференцировки клеток по данным направлениям в интересах лечения животных с моделированными заболеваниями сердца или ЦНС.

Указанное направление нашло отражение в материале исследования M. Wernig с соавт., опубликованном в журнале PNAS в 2008 году. Первый этап исследования заключался в репрограммировании мышечных эмбриональных фибробластов посредством реактивации трансдуцированных ретровирусных векторов, содержащих Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4. Культура iPS клеток характеризовалась способностью формировать шаровидные эмбриоидные тела, а при культивировании в среде без сыворотки с добавлением FGF₂ клетки по морфологии соответствовали предшественникам нейронов и экспрессировали транскрипционные факторы, характерные для нейральных стволовых клеток – nestin, Sox2 и Brn2. Через неделю культивирования без FGF₂, в культуре определялись βIII-тубулин-позитивные нейроны, GFAP-положительные астроциты и O4-позитивные олигодендроциты. С течением времени инкубирования в культуре определялась все более выраженная иммуногистохи-

мическая реакция на тирозингидроксилазу (tyrosine hydroxylase, TH), участвующую в биосинтезе катехоламинов, и везикулярный транспортер моноаминов (vesicular monoamine transporter 2, VMAT2), ответственный за их перемещение в синаптические пузырьки.

Исследователи трансфецировали клетки-предшественницы нейронов лентивирусными векторами с GFP (green fluorescent protein), чтобы оценить миграцию клеток в ЦНС после внутриутробного введения культуры в боковые желудочки головного мозга 13–14-дневных мышечных эмбрионов. Спустя 1–9 нед. меченые клетки были обнаружены в виде интравентрикулярных кластеров, а также субэпендимально. Наибольшее количество GFP-позитивных клеток определялось в прозрачной перегородке, полосатом теле, гипоталамусе и среднем мозге, меньшее – в обонятельных луковицах, коре и таламусе. Исследуемая популяция экспрессировала, как и в опыте *in vitro*, основные маркеры нейронов (βIII-тубулин, NeuN) и глиальных клеток (GFAP). Привитые предшественницы нервных клеток давали начало различным подтипам нейронов: глутаматэргическим, TH-положительным катехоламинэргическим.

Иммунофлюоресцентный анализ меченых клеток выявил их типичное нейрональное строение, а посредством конфокальной микроскопии авторы показали наличие многочисленных дендритных шипиков на нейролеме исследуемых клеток, а также непосредственный контакт с ними синаптофизин-позитивных GFP-отрицательных клеток реципиента. Электрофизиологическое исследование субвитаальных срезов мозга, полученных от животных, перенесших трансплантацию, выявило проведение потенциалов действия между нативными и трансплантированными нейронами. Потенциал покоя дериватов введенных клеток находился в интервале от –55 мВ до –63 мВ, а потенциал действия достигал 70–82 мВ, что несколько выше нормальных значений. Полученные данные свидетельствуют о морфо-функциональной интеграции трансплантированных клеток и нейронов реципиента.

Исследователи экстраполировали успешные результаты начального этапа работы в доклиническое исследование на мышцах с дегенеративно-дистрофическим заболеванием ЦНС – болезнью Паркинсона. С целью устранения патологии взрослым животным с указанным заболеванием, смоделированным введением 6-гидроксидофамина в полосатое тело, трансплантировали культуру дифференцированных нервных клеток численностью $1-3 \times 10^5$ в среднего мозга. После 4 нед. эксперимента было показано, что TH-позитивные клетки в группе опыта выявляются во всем объеме среднего мозга, а в контроле – животные с болезнью Паркинсона без трансплантационных мероприятий – положительная реакция на TH наблюдалась лишь в части черной субстанции и

в дорсальном отделе полосатого тела. Кроме того, введенные нейроны экспрессировали также En1, VMAT2 и транспортер дофамина.

При стимуляции амфетамином движения мышей контрольной группы характеризовались вращением и уклоном в сторону, соответствующую стороне среднего мозга, в которой была нарушена функция дофаминовых нейронов посредством инъекции 6-гидроксидофамина. У большинства животных, перенесших трансплантацию iPS-полученных нейронов, наблюдалось восстановление нормального характера движений.

Исследователи показали экспрессию Ki-67 – маркера пролиферации – в области введения клеток, связывая этот факт с пролиферационной активностью трансплантированной культуры, а также выявили «тератомы», источником которых, по мнению авторов, являлись немногочисленные недифференцированные SSEA1-положительные клетки, содержащиеся в культуре трансплантируемых нейронов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Freed C.R., Greene P.E., Breeze R.E. et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 710–19.
2. Lim J., Byeon Y., Ryu H. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J. Vet. Sci.* 2007; 8(3): 275–82.
3. Jawad H., Ali N.N., Lyon A.R. et al. Myocardial tissue engineering: a review. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007; 1(5): 327–42.
4. Wernig M., Zhao J., Pruszak J. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *PNAS* 2008; 105(15): 5856–61.
5. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of

Наиболее вероятно, что присутствие недифференцированных клеток было связано с недостаточной индукцией дифференцировки части iPS клеток по линии нейронов. С целью предупреждения формирования опухолей, исследователи в последующем проводили селекцию SSEA1-позитивных элементов из высокоспециализированной культуры с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортирования, что предотвращало образование «тератом».

Таким образом, исследователи продемонстрировали возможность применения высокоспециализированных аутогенных клеток, полученных с использованием явления репрограммирования, в целях устранения дегенеративно-дистрофической патологии ЦНС. В целом, этот подход является перспективным путем решения проблемы поиска клеточного материала, предназначенного для трансплантации, при условии воспроизводимости экспериментальных результатов.

- fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151): 260–2.
6. Takahashi K., Yamanaka S., Tanabe K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007; 131(5): 861–72.
7. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.
8. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313–7.
9. Yu J., Vodyanik M.A., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917–20.
10. Hanna J., Wernig M., Markoulaki S. et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318: 1920–23.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам Wernig M., Zhao J., Pruszak J. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *PNAS* 2008; 105(15): 5856–61

Обновление клеточного состава костного мозга Trp53^{-/-}/p16Ink4a^{-/-}/p19Arf^{-/-} гемопоэтическими клетками-предшественницами

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – резиденты костного мозга, дающие начало гемопоэтическим мультипотентным клеткам-предшественницам [1]. В отличие от ГСК, мультипотентные клетки-предшественницы не обладают способностью к длительному самообновлению популяции, и после определенного числа делений их пролиферация прекращается [2]. Молекулярные механизмы, отвечающие за этот процесс, ясны не до конца [3], однако известна система из четырех генов, которая регулирует самообновление ГСК и ограничивает пролиферацию их производных. Это, прежде всего, ген Bmi-1 [4, 5], необходимый для самообновления популяции ГСК. Bmi-1 является негативным регулятором двух генов-репрессоров самообновления – Trp53 и Cdkn2a, последний из которых имеет две альтернативные рамки считывания: p16Ink4a, p19Arf и, соответственно, два белковых продукта со сходными функциями [6]. Эти гены функционируют не только в ГСК и клетках гемопоэтического ряда. Например, для нейрональных клеток-предшественниц с дефицитом экспрессии Bmi-1 было показано, что их активная пролиферация

и самообновление частично восстанавливаются при искусственной супрессии p16Ink4a^{-/-} и p19Arf^{-/-} [7].

Исследователи из группы O.O. Akala и соавт. предположили, что разные нарушения экспрессии указанных генов могут быть причиной возникновения онкологических заболеваний, при которых наблюдается неограниченная пролиферация клеток-предшественниц гемопоэтического ряда и их потомков. Для проверки этого предположения были проанализированы эффекты одновременной делеции локусов Trp53, p16Ink4a и p19Arf, а также делеций каждого из локусов по отдельности на способность ГСК и мультипотентных гемопоэтических клеток-предшественниц к обновлению костного мозга реципиентов, подвергшихся радиоактивному излучению в летальных дозах.

В клеточном составе костного мозга, периферической крови, печени и селезенки всех мутантов не было выявлено каких-либо отличий в сравнении с интактными животными. То есть делеции Trp53, p16Ink4a и p19Arf не влияют на дифференцировку ГСК и не подавляют ни один из ростков