

Трансдифференцировка мезенхимальных стромальных клеток в миелинизирующие леммоцитоподобные клетки

Миелинизирующие клетки – олигодендроциты в ЦНС и шванновские клетки в периферической нервной системе (ПНС) играют ключевую роль в развитии как нейродегенеративных, так и регенераторных процессов. Демиелинизирующие заболевания и травматические повреждения нервной системы приводят к тяжёлым функциональным расстройствам у пациентов. Одним из типичных демиелинизирующих заболеваний является рассеянный склероз, приводящий к практически полной нетрудоспособности заболевших. Развитие аутоиммунной реакции приводит к разрушению миелиновых оболочек, потере олигодендроцитов и, в конечном итоге, к гибели аксонов. (Kornek and Lassmann, 1999; Lucchinetti et al., 1999). Шванновские клетки ответственны за демиелинизацию в случае аутосомной нейропатии ПНС и некоторых других демиелинизирующих заболеваний. Основной причиной этого расстройства считается нарушение подвижности шванновских клеток, их способности к миграции, что приводит к последующим нарушениям формирования миелиновой оболочки (Nobbio et al., 2004; Runker et al., 2004).

Для восстановления дефектов, возникающих в результате демиелинизации ПНС, применяли аутогенные трансплантаты нервов. Однако основной проблемой метода является ограниченная доступность аутогенной ткани. К настоящему времени было проведено множество исследований, направленных на поиск альтернативных синтетических и биогенных трансплантатов. Было обнаружено (Lundborg, 2004; Wiberg and Terenghi, 2003), что успешная регенерация достигается только в случае добавления в такой биоинженерный трансплантат шванновских клеток, поскольку они «наслаивают» миелин вокруг растущего аксона. (Fansa and Keilhoff, 2004; Stang et al., 2005). Интересно, что шванновские клетки способны фрагментировать разрушенный миелин и фагоцитировать его, что служит важным фактором для последующей ремиелинизации и восстановления функции нейронов в ПНС. (Stoll and Muller, 1999). Благодаря таким свойствам, шванновские клетки считаются одним из самых привлекательных для терапии демиелинизирующих заболеваний ПНС.

Человеческие шванновские клетки для аутогенной трансплантации получают из биоптатов, однако использование такого материала имеет серьёзные недостатки, такие как ограниченность митотической активности в культуре, а также повышенный риск образования невром. Альтернативным источником шванновских клеток могли бы стать эмбриональные или «взрослые» стволовые клетки. Среди них наиболее многообещающей является популяция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК) (Bianco et al., 2001). Эти клетки способны дифференцироваться преимущественно в клеточные линии мезодермального происхождения (Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997). Однако в присутствии определённых стимулов и условий среды ММСК способны трансдифференцироваться *in vitro*, а также дифференцироваться в клетки не мезодермального происхождения, включая нейроны (Deng et al., 2001; Woodbury et al., 2000), миелинизирующие клетки ПНС (Dezawa et al., 2001; Tohill et al., 2004) и астроциты (Koren et al., 1999).

В недавнем исследовании, опубликованном в *European Journal of Cell Biology*, была исследована способность ММСК к трансдифференцировке в миелинизирующие леммоцитоподобные клетки. Были определены условия, необходимые

для «стабильной» дифференцировки ММСК в миелинизирующие клетки.

В присутствии коктейля из факторов роста, необходимых для дифференцировки шванновских клеток (bFGF, PDGF-AA и Her-beta) крысиные ММСК изменялись морфологически, приобретая типичную веретенообразную форму, характерную для шванновских клеток, а также экспрессировали ряд маркёров, характерных для миелин-продуцирующих клеток (рецептор LNGF, Krox-20, CD104 и белок S100-beta). При этом, по сравнению с контролем (стандартная культура ММСК) снижалась экспрессия такого маркёра предшественников костной ткани как BMPR-1A.

Способность трансдифференцированных клеток (тММСК) восстанавливать повреждённый участок нерва была определена при трансгендерной трансплантации на крысиной модели с частично разрушенным седалищным нервом (Fansa and Keilhoff, 2004). Предифференцированные ММСК пересаживали в мышечных графтах, поскольку они лишены собственных шванновских клеток. Мужские клетки в тканях самки выявлялись с помощью определяющего пол гена SRY, а присутствие имплантированных клеток к графтам подтверждалось наличием белка S100 в предварительно помеченных флуоресцентным красителем ММСК. Эффективность пересадки тММСК сравнивалась с результатами трансплантации шванновских клеток и ММСК, культивированных в обычных условиях. В качестве контроля была использована пересадка «пустого» мышечного графта без клеток.

Полная регенерация в группах, которым были пересажены тММСК и шванновские клетки, достигалась через три недели после графтинга, регенерации же в контрольной группе и в группе с обычным ММСК-трансплантатом не наблюдалось. Контроль за регенерацией осуществлялся по гистологическим срезам. Подсчитывалось количество аксонов, с гистологической точки зрения выглядящих «нормально», затем проводилась морфометрическая оценка. После трансплантации тММСК отличий от нормы (нормальный нерв) не наблюдалось. Через 3 недели меченые клетки всё ещё присутствовали в графтах, образуя миелиновую оболочку вокруг вросших в графт аксонов. При этом, в противоположность шванновским клетками, каждая из которых способна формировать миелиновую оболочку только вокруг одного аксона, тММСК могли миелинизировать по несколько аксонов каждая (как олигодендроциты в ЦНС). Таким образом, трансплантированные тММСК способствовали регенерации нервных волокон в зоне повреждения, обеспечивая им необходимое микроокружение и трофику.

После трансплантации тММСК в зону повреждения седалищного нерва через 3 недели наблюдалось клиническое выздоровление лабораторных животных. В период выздоровления не было отмечено никаких внешних признаков боли, ни одно животное не погибло в ходе эксперимента. После клинического выздоровления в нерве не было обнаружено никаких воспалительных изменений.

Авторы впервые продемонстрировали эффективность трансплантации ММСК, трансдифференцированных *in vitro* в леммоцитоподобные клетки, предложив терапевтическую стратегию для лечения нейродегенеративных демиелинизирующих расстройств. Исследователи продемонстрировали способность тММСК усиливать регенерацию аксонов

и восстанавливать функцию периферических нейронов. В работе не был указан определённый фактор, индуцирующий трансдифференцировку ММСК в клетки-подобные шванновским, использовался коктейль факторов роста и добавок. Кроме того, согласно «карте маркёров» клетки после

культивирования можно лишь назвать «подобные миелин-продуцирующим». Исходя из результатов работы можно предположить, что предложенная технология найдёт дальнейшее развитие и применение в терапии демиелинизирующих нейродегенеративных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Akiyama Y., Radtke C., Kocsis J.D. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J. Neurosci* 2002; 22: 6623–30.
2. Berger P., Sirkowski E.E., Scherer S., Suter U. Expression analysis of the N-Myc downstream-regulated gene 1 indicates that myelinating Schwann cells are the primary disease target in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Neurobiol. Dis.* 2004; 17: 290–9.
3. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal

- cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180–92.
4. Brustle O., Jones K.N., Learish R.D. et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999; 285: 754–6.
 5. Fansa H., Keilhoff G. A comparison of different biogenic matrices seeded with cultured Schwann cells for bridging peripheral nerve defects. *Neurol. Res.* 2004; 26: 167–73.
 6. Fansa H., Keilhoff G., Wolf G., Schneider W. Tissue engineering of peripheral nerves: a comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2001; 107: 485–94.

Подготовила А.С. Григорян
по материалам *Eur. J. Cell. Biol.* 2006; 85: 11–24

К вопросу о происхождении фибробласта и его места в фибробластическом диффероне

Фибробласты (от лат. *fibra* – волокно и греч. *blastos* – росток) – наиболее распространённые и функционально значимые клетки рыхлой соединительной ткани, относящиеся по классическим представлениям к линии механоцитов и присутствующие в строме (соединительнотканном «каркасе») всех без исключения органов. Источником развития фибробластов в эмбриогенезе в основном является мезенхима, однако, не все фибробласты имеют мезенхимальное происхождение – так, например, фибробласты области головы и шеи развиваются из клеток нервного гребня, то есть имеют эктодермальный источник. Однако более детально вопрос о происхождении этого типа клеток и их потенциальных возможностях дифференцировки в другие клеточные типы до сих пор не изучен.

После рождения, фибробласты представляют собой сложную систему (дифферон) клеток, различающихся по степени дифференцировки, морфологическим и функциональным характеристикам. Помимо собственно фибробластов в дифферон входят адипоциты, фиброкласты, фиброциты (представляющие собой конечную стадию дифференцировки фибробластов), миофибробласты, являющиеся т. н. активированной формой фибробластов, и некоторые другие клетки, родственность которых с фибробластами остаётся спорной (например, периваскулярные клетки) [1].

Считается, что новые фибробласты образуются в соединительной ткани за счёт пролиферации резидентных тканевых фибробластов, часто называемых «незрелыми фибробластами» или менее удачным термином «мезенхимальные фибробласты» [1]. Однако в последнее время появляются сообщения о том, что фибробласты могут также иметь костномозговое происхождение. Это было продемонстрировано в исследованиях патогенеза фиброза почек [2], фиброза лёгких [3], заживления ран [4, 5] и формирования опухолей [6–8]. Но несмотря на то, что эти работы уверенно указывают на костномозговое происхождение фибробластов, остаётся неясным, какая именно клетка в пределах костного мозга даёт

начало клеткам фибробластической линии. Поскольку мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) характеризуются высокой способностью к адгезии и возможностью дифференцировки в различные клетки мезенхимальной природы, эта популяция костного мозга предполагалась как потенциальный источник фибробластов в эмбриональном развитии.

Недавние работы исследователей из Medical University of South Carolina (USA), указывают на то, что фибробласты могут происходить из гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) костного мозга [9,10]. Ранее группа продемонстрировала, что мезангиальные клетки почек [9], а также микроглиальные и периваскулярные клетки головного мозга [10], считающиеся специализированными тканевыми типами фибробластов, происходят из ГСК. В работах, опубликованных в журнале *Experimental Hematology*, исследователи подтверждают свою гипотезу о гемопоэтическом происхождении фибробластов.

Аналогично морфологии нормальных тканей, фибробласты являются самым распространённым клеточным элементом стромы солидных опухолей, где они продуцируют структурные компоненты экстрацеллюлярного матрикса, необходимого для развития опухоли. LaRue изучила способность ГСК дифференцироваться в матрикс-продуцирующие фибробласты в строме опухоли. Для этого предварительно летально облучённым мышам проводилась трансплантация клон клеток, полученных из одной ГСК, меченной зелёным флуоресцентным белком (EGFP). Эти клетки характеризовались экспрессией молекул Sca-1 и C-kit, а также отсутствием маркера стволовых клеток крови CD34. Каждый клон содержал не более 20 клеток. Затем мышам, демонстрировавшим высокий энграфтинг EGFP⁺ клеток (более 50%), после восстановления гемопоэза подкожно вводились опухолевые клетки меланомы или лёгочной карциномы Льюиса, после чего был проанализирован клеточный состав развившихся у животных опухолей.