Эта работа продемонстрировала наличие нового механизма передачи информации и контроля развития между стволовыми и соседними клетками. Авторы подтвердили гипотезу о том, что MV, полученные от ESC (ES–MV), содержат различные, специфические для стволовых клеток молекулы, в том числе и трансмембранные, которые могут воздействовать на рост и развитие, а также поддерживать самообновление и «стволовость» окружающих клеток *in vitro.* ES–MV селективно обогащаются мРНК в процессе их формирования. ES–MV могут активировать клетки своими мембранными молекулами, а также передавать белки и РНК, индуцируя трансляцию. Эти наблюдения могут выявить новый механизм горизонтального переноса генетической информации между клетками, а также выявить те молекулы, которые лежат в основе биологического феномена репрограммирования ядра зрелой соматической клетки факторами овоцита при его переносе или слиянии. [6, 8,14].

Возможно, что такой перенос информации обеспечивает распространение трансгенов или малых интерферирующих РНК в соматических клетках. Также не исключено, что в этих везикулах обнаружатся малые ядерные РНК, которые наряду с белками играют роль факторов транскрипции. ES–MV имеют преимущества перед рекомбинантными факторами роста или цитокинами, так как лучше поддерживают плюрипотентное состояние клеток, вызывая экспрессию факторов транскрипции, поэтому MV могут стать хорошим средством поддержания стволовой клеточной линии. Сейчас еще не ясно, насколько транспорт молекул через MV распространен в клеточной биологии. Безусловно, необходимы дальнейшие исследования содержания РНК и белков в ES–MV, а также антигенов, которые могут вызвать иммунный ответ.

Ученые ожидают, что анализ белков ES–MV поможет найти такие молекулы, которые отличают клетки внутренней массы бластоцисты от будущего трофобласта, а также влияют на раннее развитие ES–клеток. Возможно, именно такие молекулы ответственны за поддержания «стволовости» или запуск дифференцировки.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Janowska–Wieczorek A., Majka M., Kijowski J. et al. Platelet–derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. Blood 2001; 98(10): 3143–9.
2. Baj–Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D. et al. Platelet–derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. Exp. Hematol. 2002; 30(5): 450–9.
3. Parker M.A., Bell M.L., Barlow L.A. Cell contact–dependent mechanisms specify taste bud pattern during a critical period early in embryonic development. Dev. Dyn. 2004; 230(4): 630–42.
4. Cole F., Zhang W., Geyra A. et al. Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO. Dev. Cell 2004; 7(6): 843–54.
5. Morel O., Toti F., Hugel B., Freyssinet J.M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. Curr. Opin. Hematol. 2004; 11(3): 156–64.
6. Do J.T., Scholer H.R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. Stem Cells 2004; 22(6): 941–9.
7. Cowan C.A., Atienza .J, Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science 2005; 309(5739): 1369–73.
8. Landsverk H.B., Hakelien A.M., Kuntziger T. et al. Reprogrammed gene expression in a somatic cell–free extract. EMBO Rep. 2002; 3(4): 384–9.
9. Sato N., Meijer L., Skaltsounis L. et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK–3–specific inhibitor. Nat. Med. 2004; 10(1): 55–63.
10. Reya T., Duncan A.W., Ailles L. et al. A role for Wnt signalling in self–renewal of haematopoietic stem cells. Nature 2003; 423(6938): 409–14.
11. Niwa H, Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct–3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self–renewal of ES cells. Nat. Genet. 2000; 24(4): 372–6.
12. Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M. et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98(11): 6407–11.
13. Holmgren L., Szeles A., Rajnavolgyi E. et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. Blood 1999; 93(11): 3956–63.
14. Hakelien A.M., Landsverk H.B., Robl J.M. et al. Reprogramming fibroblasts to express T–cell functions using cell extracts. Nat. Biotechnol. 2002; 20(5): 460–6.

Подготовила Т.В. Лопатина
по материалам Leukemia 2006 Feb 2; Epub. doi: 10.1038/sj.leu.2404132

Управляемая экспансия гемопоэтических стволовых клеток *in vivo*

Экспансия (размножение) гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) – перспективное направление клеточной терапии и развития бизнеса, связанного с банкированием пуповинной крови. Все исследования, которые были опубликованы по этому вопросу, описывают различные способы экспансии ГСК *ex vivo* [1–6]. Основной целью экспансии ГСК *ex vivo* является получение их достаточного для трансплантации и реализации терапевтического эффекта количества при сохранении функциональных свойств (способность приживаться и поддерживать длительный гемопоэз) [1]. Основными направлениями решения этой задачи являются: 1) выбор оптимальной популяции ГСК для экспансии; 2) определение особенностей экспансии популяций ГСК, которые подвергаются энграфтингу; 3) обнаружение новых факторов (агентов), влияющих на деление ГСК *ex vivo* и *in vivo* [2].

Большинство протоколов экспансии ГСК *ex vivo* используют цитокины и факторы роста [1–4]. Недавно была описана группа так называемых ангиопоэтин–подобных белков (Angptl), синтезируемых клетками эмбриональной печени и способных повысить в количество ГСК в культуре 20–30 раз. Авторы предполагают, что Angptl активизируют сигнальные пути, отличные от тех через которые действуют известные гемопоэтические факторы – SCF, TPO, IGF–2 или FGF–1 [11]. Современные работы посвящены пониманию молекулярных механизмов, способных влиять на размножение ГСК [4,5]. Так, большое значение имело исследование Wnt–сигнального пути [5], активация которого через экспрессию гена HoxB4 способствует экспансии ГСК [6]. Неотъемлемым компонентом Wnt–механизма является её негативный регулятор – гликоген–синтаза–киназа–3 (GSK–3) [8] GSK–3 – ключевой фермент, вызывающий также модуляцию Notch–сигнального пути [9].

Совеременный взгляд на роль Notch– и Wnt– сигналов в дифференцировке и экспансии ГСК изложен в недавней работе Duncan [10].

Работа, недавно опубликованная в Nature Medicine, по своей сути является первой, в которой описывается управляемая экспансия мышиных и человеческих ГСК *in vivo*. Опираясь на данные, описывающие участие GSK–3 в 2–х сигнальных путях [8, 9], регулирующих количество ГСК, авторы работы решили проверить насколько эффективно ингибитор этого белка сработает в качестве терапевтического агента, влияющего на энграфтинг и количество ГСК *in vivo*.

Выполняли трансплантации меченых ГСК в SCID–мышей, на фоне введения ингибитора GSK–3 и без него. Оказалось, что энграфтинг ГСК и их общее количество значительно больше в мышах с применением ингибитора GSK–3. В разное время, до 4 недель, в периферической крови, наблюдали репопуляцию всех кроветворных ростков клетками донора. Лечение ингибитором GSK–3 обусловливало устойчивый энграфтинг спустя 11 недель после трансплантации, при этом количество клеток Lin^- увеличилось в 10 раз. Аналогичные результаты были получены учёными и в экспериментах с человеческими ГСК (Lin^-), выделенными из пуповинной и мобилизированной периферической крови. При этом наблюдали репопуляцию как миелоидного так и лимфоидного ростков, а общее количество ГСК ($CD34^+/CD38^-$) возрастало в 2 раза. При исследовании колониеобразующей способности человеческих ГСК, размноженных *in vivo* при помощи ингибитора GSK–3, было установлено, что их количество также увеличивается. Таким образом, исследователи заключают, что ингибитор GSK–3 является видо–неспецифичным агентом, вызывающим экспансию ГСК *in vivo*, и при этом не повреждающим их функцию.

При выяснении механизма действия ингибитора GSK–3 исследователи показали, что этот белок увеличивает количество только «примитивных» гемопоэтических клеток – $Lin^-/c\text{–}Kit^+/Sca\text{–}1^+$ мыши и $CD34^+$ человека исходно находящихся в митотической фазе. Это было показано как *in vivo*, так и *in vitro* на нескольких линиях мышей. В специальных модельных экспериментах было показано, что введение ингибитора GSK–3 моделирует активность 3 основных сигнальных путей, регулирующих деление ГСК – Wnt [10], Notch [9] и Hedgehog [12]. Так, наблюдали усиление работы генов, связанных с «включением» Wnt–пути на 28% в $Lin^-/c\text{–}Kit^+/Sca\text{–}1^+$ клетках, но не $Lin^+/Sca\text{–}1^-$. Аналогично показали усиление экспрессии генов, связанных с активацией Notch– пути, однако снижение активности генов Hedgehog– пути в ГСК экспериментальных (леченых) мышей. Модуляция этих сигнальных путей ингибитором GSK–3 была подтверждена и *in vitro*. Эти данные показывают, что этот белок специфически и прямо влияет только на «ранние» ГСК, но не на прогениторные клетки и нишу.

Применение только ингибитора GSK–3 без трансплантации ГСК также снижало летальность мышей, что, по–видимому, может указывать на стимуляцию деления собственных, устойчивых к облучению ГСК. Кроме того, применение ингибитора GSK–3 значительно ускоряло «выход» из нейтропении и мегакариоцитопении, длительно поддерживало высокую репопуляцию гемопоэза донора вне зависимости от количества пересаженных клеток. Однако, при серийных трансплантациях (вторичных) ГСК, размноженных введением ингибитора GSK–3, дальнейшей их экспансии не наблюдали.

Это исследование продемонстрировало возможность регулировать экспансию ГСК *in vivo*. Применение ингибитора GSK–3 значительно увеличивает количество ранних ГСК мыши и человека, их репопуляционную (*in vivo*) и колониеобразующую активность (*in vitro*). Точкой клинического приложения может стать способность этого белка усиливать энграфтинг и репопуляцию ГСК. Поскольку ингибитор ГСК–3 сокращает период восстановления из цитопении и увеличивает выживаемость мышей после трансплантации ГСК, то этот агент безусловно имеет большие клинические перспективы. Подобные препараты найдут своё применение в клинике трансплантации костного мозга в случаях недостаточного количестве ГСК в пересаживаем образце, как это часто бывает, например, при трансплатации клеток пуповинной крови взрослым пациентам с лейкемией.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Srour E.F., Abonour R., Cornetta K., Traycoff C.M. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells: are we there yet? J. Hematotherю 1999; 8: 93–102.
2. Shih C.–C., DiGiusto D., Forman S.J.. Ex vivo expansion of transplantable human hematopoietic stem cells: where do we stand in the year 2000? J. Hematother. & Stem Cell Research 2000; 9: 621–8.
3. Heike T., Nakahata T. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. Biochem. Biophys. Acta 2202; 1592: 313.
4. Nakano T. Hematopoietic stem cells: generation and manipulation. Trends Immunol. 2003; 24: 589–94.
5. Reya T., Duncan A.W., Ailles L. et al. A role for Wnt signalling in self–renewal of haematopoietic stem cells. Nature 2003; 423: 409–14.
6. Amsellem S., Pflumio F., Bardinet D. et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. Nat. Med. 2003; 9: 1423–7.
7. Krosl J., Austin P., Beslu N. et al. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT–HOXB4 protein. Nat. Med. 2003; 9: 1428–32.
8. Frame S., Cohen P. GSK–3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. Biochem. J. 2001; 359: 1–16.
9. Foltz D.R., Santiago M.C., Berechid B.E., Nye J.S. Glycogen synthase kinase–3b modulates Notch signaling and stability. Curr. Biol. 2002; 12: 1006.
10. Duncan A.W., Rattis F.M., DiMascio L.N. et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. Nat. Immunol. 2005; 6: 314–22.
11. Cheng C.Z., Megan K., Guangtao G. et al. Angiopoietin–like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. Nat. Med. 2006; 12: 240–5.
12. Jia J., Amanai K., Wang G. et al. Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus. Nature 2002; 416: 548–52.

Подготовил А.Л. Поспелов
по материалам Nat. Med. 2006; 12: 89