ЛИТЕРАТУРА:

1. Rubio D., Garcia–Castro J., Martin M. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2005; 65(8): 3035–9.
2. Miura M., Miura Y., Padilla–Nash H. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. Stem Cells 2006; 24(4): 1095–103.
3. Wang Y., Huso D., Harrington J. et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytotherapy 2005; 7(6): 509–19.
4. Tolar J., Nauta A., Osborn M. et al. Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells online 2006; Oct. 12.
5. Boyer L., Lee T., Cole M. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005; 122: 947–56.
6. Orkin S. Chipping away at the embryonic stem cell network. Cell 2005; 122: 828–30.
7. Kucia M., Reca R., Campbell F. et al. A population of very small embryonic–like (VSEL) CXCR4(+)SSEA–1(+)Oct–4+ stem cells identified in adult bone marrow. Leukemia 2006; 20(5): 857–69.
8. Reyes M., Verfaillie C. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001; 938: 231–3.

Подготовил В.С. Сергеев
По материалам: Neoplasia 2006; 8/9: 716–724

Трансплантация фоторецепторных клеток для коррекции слепоты в эксперименте

Среди причин частичной или полной утраты зрения значительная доля приходится на патологию фоторецепторного аппарата – врожденных аномалий, отслойку сетчатки различного генеза, пигментную дистрофию сетчатки и др. К сожалению, существующие способы лечения не всегда эффективны, а при ряде заболеваний радикальные методы коррекции вообще отсутствуют. Вместе с тем, установлено, что 80–90% информации о состоянии внешнего мира человек получает посредством зрения. Утрата этого чувства или его существенное ослабление приводит к стойкой инвалидизации, почти полной социальной дезадаптации.

Сетчатая оболочка глаза – сложно устроенная структура, по своему гистогензу вполне соответствующая части головного мозга, вынесенной на периферию организма. На 4–5–й неделях эмбриогенеза происходит выпячивание глазного пузыря из материала выстилки переднего отдела будущего мозга. На этой стадии будущая сетчатка представлена двумя слоями нейробластов.

В дальнейшем происходит увеличение количества клеток и их дивергентная дифференцировка, которая приводит к тому, что к 8–му месяцу внутриутробного развития человека формируется морфологически дефинитивная сетчатка. Функциональное «созревание» фоторецепторного аппарата происходит и после рождения. В сетчатке выделяют 10 слоев, три из которых представляют собой уровни расположения последовательно соединенных нейронов.

Слой, в котором расположены первые нейроны зрительного анализатора, граничит с пигментными клетками. Возбуждение, возникшее в фоторецепторных нейронах – палочках и колбочках, передается на второй нейрон – биполярный; в дальнейшем их отростки переключаются на ганглионарные клетки, чьи аксоны и формируют зрительный нерв. Таким образом, фоторецепторные клетки – палочки и колбочки, расположенные в наружном ядерном слое, являются видоизмененными нейронами, интегрированными в сложную нейронную сеть сетчатки, и, как свойственно подавляющему большинству нейронов, камбиальные элементы для клеточной регенерации сетчатки практически отсутствуют.

Еще в 20–х годах прошлого века исследователи предпринимали попытки трансплантации фоторецепторного аппарата (у земноводных). Первая успешная пересадка сетчатки млекопитающего датируется 1959 годом, когда были трансплантированы части сетчатки. Будучи помещенными в глазные среды, они не погибали сразу, но и не интегрировались в сетчатку реципиента [1].

В дальнейшем реципиентам пересаживали нейробласты – предшественники палочек и колбочек, полученные из фетального материала. Предпринимались попытки осуществлять трансплантации после этапа культивирования *in vitro*; трансплантировались фоторецепторы взрослых особей, однако результаты этих исследований были весьма противоречивы и не получили существенного дальнейшего развития [2, 3]. Одним из критериев успешной трансплантации является формирование синаптических связей между фоторецепторами и нейронами реципиента, чего удавалось добиться лишь в единичных случаях [4, 5]. Однако, настоящих успехов удалось добиться только исследовательской группе R. MacLaren и R.R. Ali, о чем сообщил журнал Nature 9 ноября 2006 г.

Исследователи из Британии считают, что пересаживать следует не ранние предшественники палочек и колбочек, а постмитотические прекурсоры – на стадии начала образования межклеточных синаптических связей. В ходе эксперимента, выполненного на мышах, страдающих генетическим дефектом – дегенерацией сетчатки, показано, что пересаженные клетки, полученные от трансгенных (GFP+, CFP+) реципиентов на сроках от 1 до 15 дня постнатальной жизни, способны колонизировать сетчатку в пределах наружного ядерного слоя и дифференцироваться в фоторецепторы. Наибольший успех был достигнут с применением клеток, полученных от мышат в возрасте 3–5 дней. Реципиентам инъецировали от 300 до 1000 клеток в субретинальный слой. Пересаженные клетки дифференцировались в морфологически идентифицируемые палочки и колбочки. Они формировали функционирующие синаптические связи с биполярными клетками, что было доказано возникновением и проведением электрических потенциалов в ответ на освещение и поведением ранее слепых мышей.

Вероятность слияния пересаженных клеток с фоторецепторами реципиента была сведена к минимуму посредством пересадки GFP+ клеток CFP+ реципиентам. При конфокальной микроскопии кофлюоресценция не была обнаружена ни в одном из наблюдений. Кроме того, ядра пересаженных клеток были маркированы BrdU, что также подтвердило донорское происхождение сформированных фоторецепторных клеток в сетчатке реципиента. Показано, что клетки, полученные от животных в возрасте до 3–х дней, еще способны делиться, позже они мигрируют в область наружного ядерного слоя.

Авторы указывают, что установленные на мышах закономерности лишь открывают перспективы для дальнейших исследований в области лечения заболеваний сетчатки у человека. По степени морфо-функциональной зрелости предшественники фоторецепторов 3–5 дня жизни у мышей соответствуют таковым у человека во втором триместре внутриутробной жизни. По понятным причинам данный клеточный материал не может рассматриваться как перспективный для пересадок. Вместе с тем, сотрудники той же исследовательской группы показали, что прогрессивное развитие постмитотических предшественников палочек и колбочек ассоциировано с началом функционирования транскрипционного фактора Nlr. Пересаженные клетки, находящиеся на этой стадии развития, характеризовались лучшим приживлением и дифференцировкой в фоторецепторы. Активацию данного фактора наблюдали и в культуре эмбриональных стволовых клеток человека. Вероятно, ЭСК, отобранные на стадии активации данного фактора, способны к прогрессивной дифференцировке в фоторецепторные клетки сетчатки, что, по мнению исследователей, приведет в ближайшие 5 лет к созданию клеточной биотехнологии лечения патологии сетчатки у человека.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Royo P.E., Quay W.B. Retinal transplantation from fetal to maternal mammalian eye. Growth 1959; 23: 313–36.
2. del Cerro M., Notter M.F., del Cerro C. et al. Intraretinal transplantation for rod-cell replacement in light-damaged retinas. J. Neural Transplant. 1989; 1(1): 1–10.
3. Silverman M.S., Hughes S.E. Photoreceptor transplantation in inherited and environmentally induced retinal degeneration: anatomy, immunohistochemistry and function. Prog. Clin. Biol. Res. 1989; 314: 687–704.
4. Silverman M.S., Hughes S.E., Valentino T.L., Liu Y. Photoreceptor transplantation: anatomic, electrophysiologic, and behavioral evidence for the functional reconstruction of retinas lacking photoreceptors. Exp. Neurol. 1992; 115(1): 87–94.
5. Aramant R.B., Seiler M.J. Progress in retinal sheet transplantation. Prog. Retin. Eye Res. 2004; 23(5): 475–94.
6. Mears A.J., Kondo M., Swain P.K. et al. Nrl is required for rod photoreceptor development. Nature Genet. 2001; 29: 447–52.

Подготовил Р.В. Деев
По материалам: Nature 2006, 444: 203–7

Трансплантация мезангиобластов – новый подход к клеточной терапии миодегенеративных заболеваний

В последние годы для лечения наследственных миопатий (главным образом, миопатии Дюшенна) в эксперименте и в клинике используют трансплантацию скелетных миобластов и клеток костного мозга [1]. Однако, исследователи не удовлетворены результатами таких трансплантаций в связи с гибелью клеток, иммунным ответом и быстрой «потерей эффекта» [1, 2]. Поэтому продолжается поиск клеточных популяций, которые были бы способны стабильно и длительно поддерживать достаточный уровень белка дистрофина (с дефицитом которого связано развитие миопатии Дюшенна – МД) в поражённых мышцах без иммунных реакций. В журнале Nature опубликована экспериментальная работа итальянской группы Sampaolesi et al., посвящённая разработке нового метода клеточной терапии МД на оригинальной модели.

Известно, что как аутогенные, так и аллогенные стволовые клетки способны стимулировать синтез дистрофина в мутантных миобластах мышей [3]. Однако мыши не демонстрируют клинических проявлений заболевания, а потому не могут считаться подходящим модельным объектом. Одной из лучших моделей МД считаются mxd-собаки [2]. Оказалось, что миопатия Дюшенна сходным образом протекает у человека и у золотистого ретривера (порода собак), поэтому именно данную mxd-модель использовали авторы работы. У этих собак, как и у человека, при недостатке дистрофина наблюдается сильная деградация мышечных волокон, что приводит к параличу сначала скелетной, а затем пищеварительной и дыхательной мускулатуры, в результате чего они погибают, не достигнув годовалого возраста.

Исследователи использовали в качестве трансплантата обнаруженные ими ранее взрослые стволовые клетки – мезангиобласты, которые получали из фрагментов биопсийного материала мышц. [4]. Клетки имели фенотип $CD13^+/CD44^+/CD34^-/CD45^-/CD31^-/CD117^-$. Интересно, что мезангиобласты являются самообновляющейся популяцией, и вместе с тем коммитированы к развитию в миобласты [4]. Мезангиобласты демонстрируют неоспоримые преимущества перед другими взрослыми клетками, также способными дифференцироваться и мигрировать в скелетные мышцы. Их достаточно легко изолировать и поддерживать в культуре, при этом они не теряют способности развиваться в миобласты. При трансфузии мезангиобластов в крупные артерии они трансмигрируют через сосудистые стенки и приживляются в повреждённых мышцах, стимулируя быстрые процессы регенерации [5].

Эксперимент проводили на тринадцати собаках, которые получали либо аллогенные несовместимые донорские мезангиобласты от здоровых особей, либо – аутогенные, но с введением конструкции, несущей ген микродистрофина (укороченной формы дистрофина). Трансфекция проводилась для коррекции генетического повреждения, которое несли аутогенные клетки, а укороченная форма белка использовалась потому, что она способна выполнять все функции полноразмерной молекулы, но при этом гораздо легче встраивается в вирусный вектор [6]. При трансплантации как аутогенного, так и аллогенного материала проводилась сопутствующая иммуносупрессия по различным схемам. Для увеличения эффективности терапии производились трансфузии клеток до пяти раз с интервалом в месяц. Наблюдения за собаками производились от пяти до тринадцати месяцев после завершения эксперимента (в зависимости от их выживаемости).

Трансфузия как аутогенных, так и аллогенных мезангиобластов приводила к восстановлению экспрессии дистрофина во всех группах мышц экспериментальных животных. Белок обнаруживался не только в мышцах конечностей