

ных и гемопоэтических клеток. Тем не менее, вероятность существования и пролиферации CD11b-клеток, контаминировавших трансплантат, была ничтожно мала. Таким образом, результаты этих экспериментов подтвердили, что клетки нейросфер ОСН крысы обладают способностью к восстановлению гемопоэза и дифференцировке в клетки крови. Вероятность слияния, как возможного механизма «псевдодифференцировки», была также отвергнута рядом экспериментов. При кокультивировании меченых клеток нейросфер и костного мозга мыши, нейросфер мыши и суспензии клеток гастролы куриного эмбриона не было выявлено ни одного факта слияния. Слияние клеток человека после трансплантации в куриную гастролу было также исключено анализом ДНК и ядер. Таким образом, в работе было доказано, что в ОСН человека (а также крысы и мыши) существуют мультипотентные стволовые клетки. Остаётся неясной природа этих клеток. Хотя их и можно считать нейрональными стволовыми, поскольку они образуют нейросферы в культуре с экспрессией нестина и маркёров всех типов нервных клеток. Однако, это могут быть как клетки обонятельного нейроэпителлия (olfactory ensheathing cells и нейроклетки, выделенные Roisen F.J. и Zhang X. [4, 5]), так и базальные клетки ОСН [7, 8]. Незначительная контаминация CD11b+ клетками (менее 1%) может быть объяснена миграцией в ОСН дендритных клеток и макрофагов, однако не отрицает факта дифференцировки. Отсутствие гемопоэтических клеток в трансплантате и неспособность клеток костного мозга образовывать сферы при культивировании в аналогичных условиях культуры (с нейросферами из ОСН) указывает на «чистоту» эксперимента и значительно снижает вероятность артефактов. Исследователи выделили

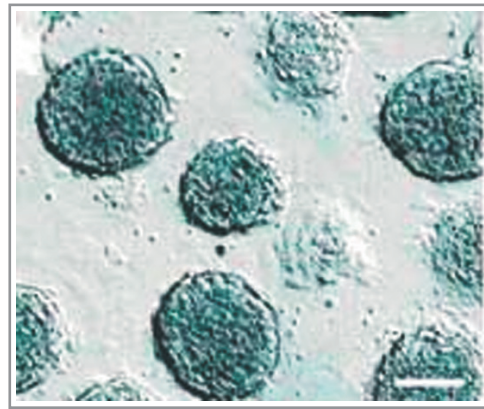


Рис. Образование нейросфер из клеток, выделенных из обонятельной области слизистой оболочки носа человека, 10 дней культивирования. Из *Dev Dyn* 2005 *Epub Mar 21*, с изменениями.

клетки с одинаковым потенциалом пластичности из 2-х гистологических структур – «обонятельного эпителия» и соединительнотканной собственной пластинки (lamina propria). «Производительность» метода составила 500–2000 сфер (около 1000 клеток в каждой) из одного биоптата в течение 7–10 дней.

Таким образом, предложен новый альтернативный аутологичный материал для регенеративной медицины. Кроме того, в настоящее время хорошо отработана техника забора такого материала без потери функции обоняния.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Bjornson C.R. et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999; 283: 534–7.
2. Shih C. et al. Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood* 2001; 98: 2412–22.
3. Morshead C. et al. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 2002; 8: 268–73.
4. Roisen F.J. et al. Adult human olfactory stem cells. *Brain Res* 2001; 890: 11–22.
5. Zhang X. et al. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined media. *Exp Neurol* 2004; 186: 112–23.
6. Barnett S.C. et al. Identification of a human olfactory ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons. *Brain* 2000; 123: 1581–8.
7. Carter L.A. et al. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 2004; 24: 5670–83.
8. Chen X., Fang H., Schwob J. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 2004; 469: 457–74.

Подготовил А.В. Берсенов;  
по материалам *Dev Dyn* 2005 *Epub Mar 21*

## Изучение спонтанной онкогенетической трансформации мезенхимальных стволовых клеток человека в культуре

Мезенхимальные стволовые (стромальные стволовые) клетки (МСК) человека считаются одним из самых перспективных видов аутологичного материала для клеточной терапии и тканевой инженерии. МСК были выделены из различных тканей взрослого человека, эмбриона и новорожденного и характеризуются рядом общих свойств, среди которых: высокая способность к пролиферации и адгезии, фибробласт-подобная морфология и образование колоний в культуре, легко-индуцируемая дифференцировка в остео-, хондро-, мио- и адипогенном направлениях. Однозначного мнения по экспрессии маркёров не существует, не описаны и уникальные маркёры МСК. Однако большинство исследователей описывает эти клетки как SH-2, SH-3, SH-4, STRO-1, Sca-1, Thy-1, CD44, CD29, CD71, CD106, CD120a, CD124 – позитивные и CD34, CD45 – негативные. В биологии МСК ещё очень много вопросов,

ответы на которые будут найдены годами кропотливых фундаментальных исследований. Однако уже сегодня начались клинические испытания по введению этих клеток с целью коррекции той или иной патологии. Вопрос об онкогенной безопасности взрослых стволовых клеток вообще и МСК в частности остаётся неизученным, но крайне актуальным, важным и определяющим будущее регенеративной медицины. Известно, что старение клетки сопряжено с укорочением теломера (потерей активности теломеразы) и остановкой клеточного цикла [1]. При культивировании клеток, в определённый момент неизбежно наступает «кризис» (остановка) клеточного цикла (фаза M1) [2]. Феномен спонтанного обхода «кризиса» остановки клеточного цикла и укорочения хромосом был установлен для человеческих клеток недавно [3]. Варианты «обхода» этого неизбежного процесса связаны с приобретением иммортальности при

укороченных теломерах, возникновением хромосомных aberrаций и канцерогенезом. В конечном итоге, накопление хромосомных мутаций приводит к неизбежному апоптозу (фаза M2) [2]. Логично было бы предположить существование такого феномена и для взрослых стволовых клеток, способных давать более 20–30 удвоений и поддерживаться в культуре до года.

Свойство иммортальности прямо связано с длиной теломер и характерно для эмбриональных стволовых и раковых клеток. Уровень теломеразы МСК человека, по мнению некоторых авторов, неопределим [4]. Было показано, что при размножении человеческих МСК *in vitro* наблюдается укорочение теломер [5], что может быть связано с обходом фазы M1. Однако имеется указание, что активность теломеразы у МСК, выделенных из жировой ткани, значительно выше, чем у МСК костного мозга [6]. Для продления жизни МСК в культуре и их экспансии, предпринимались многочисленные попытки трансфекции различными «теломеразными» ген-конструкциями (наиболее популярна hTERT). Иммортализованные МСК не меняли кариотип, фенотип и способность к дифференцировке в течение 2–3 лет [7, 8]. Но недавние исследования показывают, что иммортализация нормальных клеток человека теломеразными конструкциями, считавшаяся до этого безопасной, несёт в себе канцерогенный риск [9]. В исследовании Serakinci N. с соавт. МСК «заставляли» делиться (под действием hTERT) 256 раз и получали при этом опухоли у 100% мышей-реципиентов, а при введении линии МСК с количеством делений 95 не наблюдали развития опухолей. Интересно, что эта разница наблюдалась при неизменном нормальном кариотипе обеих линий [10].

Не связана ли высокая способность МСК к пролиферации с накоплением мутаций и онкогенным риском? Может ли онкогенная трансформация МСК происходить спонтанно? Ответы на эти вопросы можно найти в результатах недавнего исследования группы Rubio-Bernad, опубликованном в журнале Cancer Research. Исследователи выделяли МСК человека из биоптатов жировой ткани (взрослых и детей) по общепринятому методу Zuk. Клетки имели типичную фибробласт-подобную морфологию, экспрессировали CD13, CD90, CD105 и CD106, индуцировано дифференцировались в остео- и адипогенном направлении. Затем клеткам давали спонтанно пролиферировать, поддерживая их стабильный фенотип и морфологию частым пассированием. Способность к образованию опухолей *in vivo* изучали на иммунодефицитных облучённых мышах. Все свежее выделенные МСК имели нормальный кариотип и не давали роста опухолей при внутривенном введении мышам. В течение 2-х месяцев культивирования часть клеток демонстрировала признаки старения с остановкой клеточного цикла (пре-M1), сохраняя при этом нормальный кариотип. Характерным положительным тестом на «клеточный кризис» служила окраска beta-galactosidase (pH=6). Большая часть клеток, «пережившая кризис», спонтанно (пост-M1) продолжала поддерживаться в культуре до фазы M2. 30% пост-M1 клеток имели трисомию по 8 хромосоме. Следует отметить, что при трансплантации пост-M1 клеток иммунодефицитным мышам не было обнаружено никаких признаков туморогенеза (время наблюдения – 3 мес.). В половине случаев пост-M1 клетки, характеризовались ускорением клеточного цикла, высокой пролиферативной активностью и поддерживались в культуре до полугода. Эти клетки теряли экспрессию CD90 и CD105 и изменяли строение веретена деления и свою морфологию. При кариотипировании было выявлено, что большинство из них имело трисомии, тетраплоидии и прочие мутации. Эти клетки условно были названы туморогенные мезенхимальные

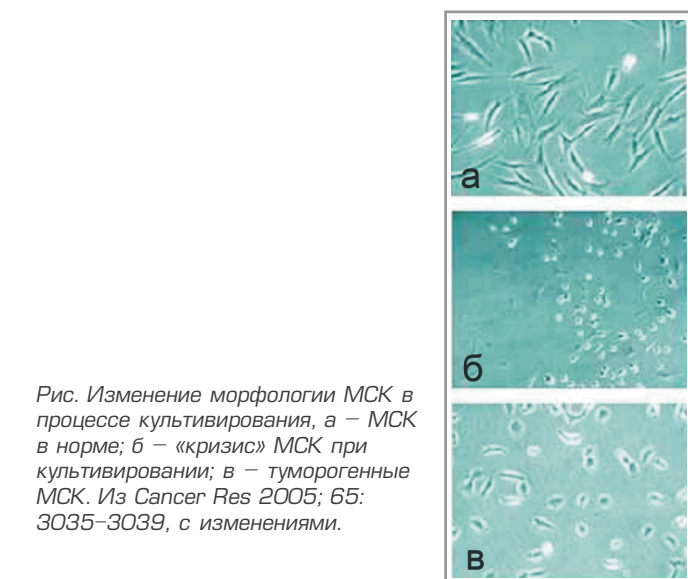


Рис. Изменение морфологии МСК в процессе культивирования, а – МСК в норме; б – «кризис» МСК при культивировании; в – туморогенные МСК. Из Cancer Res 2005; 65: 3035–3039, с изменениями.

(ТМСК). Через 4–6 недель после внутривенной трансплантации ТМСК иммунодефицитным мышам наблюдали развитие множественных опухолей почти во всех органах у всех (n=38) животных. Идентификацией меток было подтверждено, что все опухоли происходят из человеческих клеток. Клетки, выделенные из этих опухолей, демонстрировали сходные множественные мутации, те же, что и родительские ТМСК. Было показано, что развитие ТМСК с обходом фаз M1 и M2, ассоциировано с высокими уровнями экспрессии теломеразы, онкогена c-myc и ангиогенного фактора VEGF. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с МСК, выделенными из 2-х различных линий мышей (C57BL/6 и CD1). Это говорит о том, что феномен «спонтанной иммортализации и онкогенности» взрослых МСК, впервые описанный авторами в этой работе, имеет большое общебиологическое значение. Высокая частота (50% образцов) спонтанной трансформации нормальных клеток в культуре, также была впервые описана авторами для человека. Интересно, что МСК всех исследованных образцов миновали M1 фазу. Способность онкогенной трансформации МСК человека, выделенных из жировой ткани, была показана ранее под влиянием генетической конструкции hTERT [10], однако это происходило не спонтанно. До сих пор нет данных о возможной онкогенной трансформации (спонтанной или под влиянием теломеразной конструкции) МСК костного мозга.

Таким образом, авторы впервые показали, что клетки человека способны к спонтанной онкогенной трансформации в культуре без участия факторов роста. Работа приобретает особое значение в контексте потенциального клинического применения мезенхимальных стволовых клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии. Можно сделать вывод, что длительное культивирование МСК (в данной работе – более 2 месяцев) ассоциировано с высоким онкогенным риском. По-видимому, все культуры МСК, применяемые в клинике, должны быть как минимум кариотипированы на предмет исключения хромосомных мутаций. Кроме того, можно предположить, что все протоколы по иммортализации МСК теломеразными конструкциями не имеют клинического будущего в связи с высоким онкогенным риском.

## ЛИТЕРАТУРА:

- Lloyd A.C. Limits to lifespan. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E25–E27.
- Lustig A.J. Crisis intervention: the role of telomerase. *PNAS* 1999; 96: 3339–41.
- Romanov S.R. et al. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 2001; 409: 633–7.
- Zimmermann S. et al. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 2003; 17: 6: 1146–9.
- Parsch D. et al. Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Mol Med* 2004; 82; 1: 49–55.
- Li J.Y. et al. Telomerase activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004; 33; 6: 481–485.
- Mihara K. et al. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *Br J Haematol* 2003; 120; 5: 846–9.
- Shi S. et al. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 587–91.
- Milyavsky M. et al. Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res* 2003; 63: 7147–57.
- Serakinci N. et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 2004; 23; 29: 5095–8.

Подготовил А.В. Берснев;  
по материалам *Cancer Res* 2005; 65: 3035–3039.

## Перспективы трансплантации стромальных клеток костного мозга для лечения муковисцидоза

Муковисцидоз (МВ) – одно из распространённых (среди представителей европейской расы) аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, возникающее в результате мутации гена CFTR (transmembrane conductance regulator), регулирующего транспорт иона хлора через мембрану эпителиальной клетки. При этом усиливается абсорбция натрия и воды, и происходит «высушивание» слизи, продуцируемой экзокринными железами. Избыточно вязкий секрет закупоривает протоки, вследствие чего образуются множественные кисты и развивается системная дисфункция экзокринных желёз. МВ является актуальным в структуре заболеваемости и смертности (основной причиной которой является прогрессирующая дыхательная недостаточность и присоединение инфекций) среди детей и подростков [1].

За последние несколько лет было предложено несколько протоколов генотерапии МВ, использующей генетические конструкции CFTR [2–4]. Оптимальной терапевтической мишенью для доставки вектора с CFTR считается дыхательный эпителий (ДЭ), однако его трансфекции *in vivo* препятствуют избыток слизи, отсутствие рецептора для вируса на поверхности клетки, быстрая деградация ДНК и плохая интеграция вектора [2–4]. Альтернативный подход к заместительной клеточной генотерапии недавно был предложен группой Wang-Prockop. Он заключается в применении аутогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК), трансфицированных конструкцией CFTR, как потенциального источника нового (здорового) ДЭ. Подоплёкой к применению МСК для терапии МВ послужили следующие данные:

- указания на возможность дифференцировки (или слияния) МСК в эпителиальные клетки дыхательных путей *in vitro* и *in vivo* [5, 6, 8];
- хорошая миграция МСК в дефектные лёгкие *in vivo* [7, 8];
- неплохая трансфицируемость МСК различными генетическими конструкциями с уверенной экспрессией трансгена [9];
- возможность использования аутологичного материала и экспансия МСК *in vitro* в миллиард раз за 2 месяца культивирования [10, 11].

МСК забирали из крыла подвздошной кости от здоровых волонтеров и от больных МВ. Клетки выделяли и культивировали по протоколу Sekiya-Prockop [10] с масштабированием в системе клеточной фабрики (Nunc). Клетки модифицировали меткой GFP и трансгеном CFTR с последующей лекарственной селекцией. Для дифференцировки МСК применяли специальную систему культивирования

с линией дефектного (по CFTR) ДЭ или с первичными клетками, выделенными из лёгких больных МВ. Клетки кокультивировали на границе раздела жидкой и газовой (воздушной) фаз. Через 2 (и более) недели кокультивирования нормальных МСК и дефектных клеток ДЭ в такой системе наблюдали появление эпителио-подобных клеток, несущих метку МСК. Кроме того, часть GFP+ (МСК) клеток положительно окрашивалась на эпителиальные маркеры – CK-18 и occludin (~ 10% МСК), чего не наблюдалось в контрольных экспериментах (культивирование МСК в сходных условиях). После кокультивирования наблюдали экспрессию CFTR дикого типа, что подтверждали методом RT-PCR отсортированных (FACS) GFP+ клеток. То есть, часть МСК от здоровых доноров при кокультивировании подвергалась трансдифференцировке в клетки ДЭ. Феномен слияния исключали отсутствием клеток, положительно окрашивающихся одновременно как по метке МСК – GFP, так и по метке ДЭ – RFP.

Для оценки клинического потенциала метода выделяли МСК от МВ – гомозигот. Клетки больных МВ имели одинаковую со здоровыми способность к экспансии *in vitro* и дифференцировке в ткани, имеющие мезенхимальное происхождение – костную и жировую. Дефектные МСК трансфицировали CFTR. Было показано, что генетическая коррекция МСК не влияла на их способность к делению, образованию колоний и способности к дифференцировке (по сравнению клетками до трансфекции и нормальными МСК от здоровых доноров). Устойчивость экспрессии CFTR подтверждали методом RT-PCR. Наконец, при кокультивировании дефектных, трансфицированных CFTR МСК (от больных МВ) с дефектной линией ДЭ через месяц наблюдали восстановление секреции аниона хлора (по радиоактивной метке). Как и в физиологических условиях, хлор секретировался с апикальной части мембраны клеток в ответ на стимуляцию с AMP. Секреция хлора не зависела от количества МСК (5, 10 или 20%) при кокультивировании с дефектными клетками ДЭ. Оптимальное соотношение кокультуры 1:5 (20% МСК).

Таким образом, предложен новый оригинальный метод клеточно-генетической коррекции функции ДЭ у больных МВ. Исследование, проведенное на материале пациентов с МВ, продемонстрировало возможность использования аутологичных ген-модифицированных (или немодифицированных) МСК в клинической практике. Однако до начала клинических испытаний необходимо подтвердить эффективность метода на животных моделях.