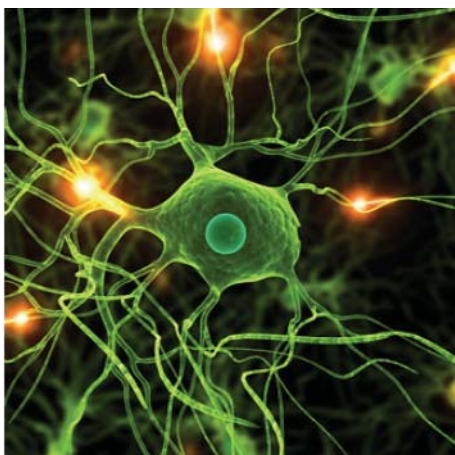


## Стовбурові клітини можуть знижувати негативні наслідки інсульту

Дослідники виявили, яким чином стовбурові клітини (СК) уповільнюють загибель нейронів після інсульту, і всупереч їхнім очікуванням відбувається це не за рахунок продукування нових клітин.



Згідно з отриманими даними, ін'єкція СК у мозок мишей, які нещодавно перенесли інсульт, може на 60% знижувати ушкодження нейронів порівняно з природним відновленням нервової тканини. Проте СК не просто заміщають ушкоджену тканину. Натомість незрілі клітини стимулюють у диференційованих клітинах мозку запуск програм, які блокують індуковану інсульту імунну відповідь (запалення), що є причиною загибелі нейронів. За словами нейробіолога Шина Савітца (Sean Savitz) з Медичного інституту при Техаському університеті у Х'юстоні, за останнє десятиріччя учені встановили, що СК здатні редукувати запалення, даючи початок новим нервовим клітинам і стимулюючи утворення нових кровоносних судин (для поліпшення живлення клітин) та аксонів (довгих виростів нервових клітин, якими інформація передається до інших клітин). Дані, що їх одержав раніше керівник проекту професор Дарвін Прокоп (Darwin Proctor) з Інституту регенеративної медицини при Техаському університеті, свідчили на користь того, що СК кісткового мозку здатні запобігати нейродеградації головного мозку, спричиненій, зокрема, хворобою Паркінсона. Проте вчені не знали точно, за рахунок чого це відбувається. Робота, опублікована ними у свіжому номері журналу *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences USA*, відкриває нові можливості для розроблення дієвіших підходів до терапії інсульту. Коагулюючи сонну артерію, що відповідає за кровопостачання головного мозку, дослідники індукували інсульт у шести мишей. Припинення надходження крові до мозку різко підвищувало активність імунної системи, клітини якої атакували і руйнували здорову тканину головного мозку. Через добу після індукованого інсульту в мозок мишей ін'єктували мезенхімні СК людини (МСК). Як пояснили автори дослідження, клітини людини було використано тому, що мишачі МСК набагато важче виділяти і культивувати в лабораторії, однак під час їх застосування отримали схожі результати. Виявилось, що СК людини здатні знижувати активність клітин імунної системи мозку миші (мікроглії). Було показано, що після ін'єкції СК людини ушкоджень клітин мозку мишей на 60% менше, ніж у контрольній групі тварин, яким ін'єкція СК не проводилась. Окрім того, миші з піддослідної групи краще справлялися з пізнавальними і поведінковими тестами. Виявлено також, що у мишей, які отримували СК, у цереброспінальній рідині спостерігався підвищений рівень речовини галектину 3. На думку вчених, концентрація цієї речовини допомагала їм оцінювати ефективність терапії. Можливо, подібну речовину надалі буде виявлено і в пацієнтів. Автори роботи заявили, що планують проведення додаткових тестів на тваринах, перш ніж застосувати цю процедуру для лікування людей. Водночас було відзначено, що деякі біотехнологічні компанії вже проводять клінічні дослідження, присвячені перевірці ефективності й безпеки застосування СК для запобігання ушкодженню нервових клітин або відновлення їх. Стандартна терапія інсульту на цей час полягає в застосуванні ензиму — активатора плазміногену, який руйнує кров'яні згустки і має бути введений не пізніше ніж за три години після інсульту (у так зване «терапевтичне вікно»). Метод клітинної терапії, що використовує СК, дає лікарям додатковий день для успішного запобігання ушкодженню нейронів.

За матеріалами сайту:  
<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3283>

## Біотех оживає



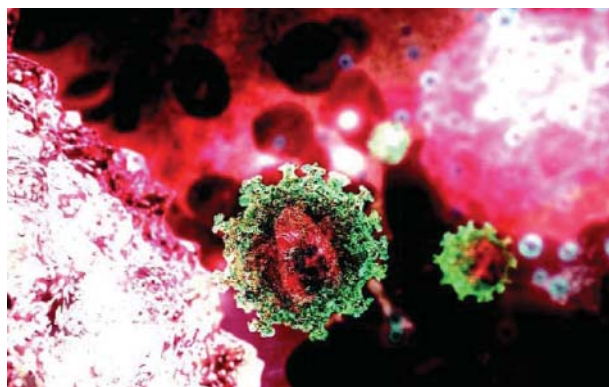
Бактерії та віруси можуть використовуватись як «живі фабрики» з виробництва наноструктур. Молекулярні наноструктури — основні елементи нанотехнології — було репліковано в клітинах бактерій. Дослідження підтверджують, що молекулярні біосинтетичні «машини» клітини можна застосовувати для масового продукування складних структур і пристроїв для молекулярної інженерії. Надріан Зеєман (Nadrian Seeman) з Нью-йоркського університету і Гао Ян з Державного університету Аризони вважають, що їхній метод сприятиме поєднанню нанотехнологій і теорії природного добору Дарвіна, завдяки чому можна буде отримати молекулярні структури, що здатні еволюціонувати. Ця техніка, яку описано в журналі *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ґрунтується на тому, що всі наноструктури насправді складаються з ДНК — генетичного матеріалу живої клітини. В останні роки ДНК вважають ідеальним матеріалом для нанотехнологій, оскільки вона може бути «запрограмована» на утворення складних структур, таких, наприклад, як геометричні клітини і впорядковані сітки. Також можна створювати подібні молекулярні «машини» з частинами, які здатні рухатися під дією зовнішніх чинників. Створення їх базується на здатності ДНК самостійно організовуватись у певні структури завдяки комплементарному з'єднанню пар азотистих основ, що визначає двониткову організацію ДНК та її форму подвійної спіралі. Принцип утворення пар азотистих основ дозволяє передбачити просторову структуру даної молекули ДНК, виходячи з її нуклеотидної послідовності. Таким чином, можна штучно створювати нитки ДНК, яка формуватиме необхідні просторові структури. Цей підхід було використано для створення наноблоків ДНК, здатної організовуватись таким чином, що з їхньою допомогою можна здійснювати обчислювальні процедури, отримавши щось на зразок механічного нанокomp'ютера, а також створювати, наприклад, докладні карти світу розміром усього в декілька нанометрів. Однак створення такої ДНК-наноструктури є довготривалим і дуже склад-

ним. Усі живі клітини при цьому містять необхідну молекулярну «машину», що здійснює синтез ДНК генома із чіткою структурою і, відповідно, певною послідовністю нуклеотидів. Це наштовхнуло учених на думку, що клітини можна «змусити» використовувати штучну ДНК. По суті, це схоже з клонуванням генетичного матеріалу — технікою, яка вже вельми добре освоєна біотехнологією. Але те, що здійснено в теорії, не завжди легко виконується на практиці — змусити клітину використовувати штучну ДНК є дуже складним завданням. Джеральду Джойсу (Gerald Joyce) та його колегам з Scripps Research Institute в Каліфорнії вже вдалося клонувати нитку ДНК, яка організовується в октаедральну клітину, причому цю ДНК було клоновано в бактеріях. Проте для того, щоб з неї вийшла октаедральна клітина, потрібно ще п'ять інших коротких ниток ДНК, які не могли бути клоновані так само. Зеєман, Ян та їхні колеги також розробили методи реплікації ДНК, що дозволяє клонувати її в лабораторних умовах за допомогою ензимів, екстрагованих із клітин. Однак вони вважають, що процес був би набагато швидший і ефективніший у живих клітинах, які можуть реплікуватися експоненціально. Аби домогтися цього, вони сконструювали нитки ДНК, яка організовується в дві складні наноструктури: одна — в якусь подібність розп'яття, а друга — у складну двоспіральну перевиту структуру, яку назвали РХ-молекулою, після чого вбудували цю ДНК у двоспіральну плазмиду, одержану з бактеріофага, і потім вбудували її в бактерію *Escherichia coli*. Така плазміда діє як вірус, що інфікував бактерію, і ця інфекція може передаватися іншим бактеріальним клітинам, які ростуть у культуральному середовищі, за допомогою бактеріального вірусу, або бактеріофага, який називається M13KO7. Врешті-решт бактерії заповнюються копіями вірусної плазмиди, зокрема елемента, що кодує ДНК наноструктур. Потім дослідники зруйнували клітини і за допомогою специфічних ферментів (рестриктаз) вирізали ДНК з плазмід, після чого вона сама набула потрібної форми. Для запуску процесу потрібна вкрай мала кількість ДНК, яку можна «ампліфікувати» в абсолютно незмінному вигляді, а бактеріальні клітини використовувати як міні-фабрики, з яких у будь-який час можна вилучати необхідну кількість матеріалу. Незважаючи на те що ДНК-наноструктура у складі живого організму теоретично може еволюціонувати, ученим спочатку слід знайти

спосіб дати тим клітинам, які роблять «поліпшені» наноструктури, перевагу в розмноженні. Гао Ян вважає, що можна розробити наноструктури з каталітичними властивостями, які прискорюють зростання або реплікацію бактеріальних клітин. «Поки що ми не розмірковували над функцією такої ДНК-структури, — зазначив він, — але, якщо їх можна клонувати, то можлива і їхня еволюція».

*За матеріалами сайту:  
<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3282>*

### **Для створення ефективної вакцини АнтиВІЛ на сьогодні недостатньо знань**



Нещодавні успіхи імунології і невдачі в розробленні вакцин проти ВІЛ-інфекції свідчать про те, що настав час переглянути існуючі підходи, що застосовуються під час створення АнтиВІЛ-вакцин. Для одержання ефективної вакцини необхідно об'єднати зусилля вакцинологів, вірусологів та імунологів. Загальноприйнятною є думка, що спроби вчених створити вакцину від ВІЛ-інфекції зазнали краху через унікальні властивості цього вірусу, такі як край високий ступінь мінливості (мутацій), що дозволяє ВІЛ «вислизати» від імунної системи, а також його здатність інфікувати основні імунокомпетентні клітини — Т-лімфоцити, що несуть на поверхні мембрани рецептори CD4. Однак на думку професора імунології Вищої школи медицини при Єльському університеті Руслана Меджітова і професора Вищої школи медицини при Нью-Йоркському університеті Дена Літтмана, невдачі в розробленні вакцин від ВІЛ-інфекції мають інші причини. Одним із керівних принципів у цій галузі могла б стати імітація вакциною упізнання патогену імунною

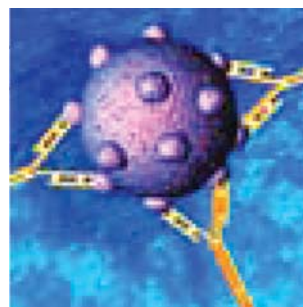
системою, що відбувається в разі зараження. Розпізнавання патогену, спровоковане вакциною, слугувало б поштовхом до запуску імунної відповіді, характерної для даного інфікуючого агента. Цей принцип є одним з основних у створенні сучасних вакцин і підтверджується тим фактом, що серед наявних вакцин найефективнішими є препарати на основі інактивованих патогенів. Проте використання інактивованих різновидів ВІЛ як вакцин не дає належного ефекту. Із цієї причини вкрай актуальним стає накопичення знань про те, яким чином вірус розпізнається імунною системою. Наші знання щодо ранніх етапів імунної відповіді істотно поповнилися за останнє десятиріччя, в основному завдяки дослідженням системи вродженого імунітету — першій негайній реакції організму на патогени, що включає механізми протимікробного захисту й активованої системи набутого імунітету. Імунній системі людини доводиться мати справу з найрізноманітнішими патогенами, починаючи з РНК-вмісних вірусів і закінчуючи 10-метровими стрічковими черв'яками. Тому абсолютно природно, що імунна система розпізнає їх і адекватно реагує на інвазію. Підтвердженням цього можуть слугувати нещодавно відкриті декілька родин мікробних сенсорів, що визначають різні класи патогенів й активують набутий імунітет за допомогою різних механізмів. Остаточного не з'ясовано, яким чином ретровірусна інфекція визначається системою природженого імунітету загалом, і як ці первинні сигнали перетворюються на активацію систем набутого імунітету. На думку Руслана Меджітова і Дена Літтмана, дотепер робилося недостатньо зусиль, спрямованих на вивчення цих процесів, що абсолютно неприпустимо, зважаючи на гостру потребу у вакцинні від ВІЛ-інфекції. Вивчення ВІЛ ускладнюється вираженим тропізмом вірусу до клітин людини, що виключає поставлення багатьох важливих експериментів. Незважаючи на те, що мишей зазвичай не використовують як модельні об'єкти у процесі вивчення ВІЛ-інфекції (оскільки ВІЛ не вражає клітини мишей), найімовірніше, існують загальні принципи упізнання ретровірусів імунною системою. Сенсори вродженого імунітету можуть розпізнавати риси механізму реплікації ретровірусів, що не є характерними для вірусів інших класів. Наприклад, ретровірусна ДНК, яка синтезується за допомогою зворотної транскрипції, могла б активувати певний сигнальний механізм. Поглиблене вивчення

виявлених останнім часом численних протеїнових чинників зараженої клітини-хазяїна, необхідних для відтворення ВІЛ, могло б пролити світло на механізми упізнання вірусу імунною системою і подальший каскад імунних реакцій, оскільки ці клітинні протеїни можуть взаємодіяти з противірусними сенсорами вродженого імунітету, які перешкоджають розповсюдженню вірусу. У сучасних підходах, що застосовуються в процесі розроблення вакцин від ВІЛ-інфекції, панують імунологічні парадигми, що ґрунтуються на результатах досліджень з антигенної імунізації та інфікування лабораторних тварин декількома модельними патогенами. Ці парадигми можуть виявитися непридатними під час розроблення вакцин від ВІЛ. Відсутність базових знань про те, яким чином імунна система відповідає на ретровірусну інфекцію, призвела до того, що підходи, які застосовувалися до сьогодні для розроблення вакцин від ВІЛ-інфекції, виявилися невдалими. Велику частину коштів, виділених на створення вакцин від ВІЛ-інфекції, було витрачено на ці численні неефективні дослідження, причому така тенденція може зберегтися й надалі — до того моменту, доки у нас не буде розуміння базових механізмів розпізнавання ретровірусної інфекції та індукування відповідної системи набутого імунітету.

*За матеріалами сайту:*  
<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3280>

### **Нові перспективи терапії моноклональними антитілами**

Метод швидкого виділення антитіл з периферичної крові людини було вперше застосовано для створення бази імунних протеїнів, що продукуються в організмі людини у відповідь на ін'єкцію антинікотинової вакцини. Роджер Берлі (Roger Beerli) та його колеги з Інституту клітинної біотехнології в місті Шлірен у Швейцарії використовували у своїй роботі лімфоцити людини, яка брала участь у клінічних випробуваннях вакцини, розробленої для людей, котрі хочуть кинути палити. За допомогою цієї технології було легко виявлено нікотинспецифічні антитіла. Робота демонструє останні досягнення в галузі терапії, що постійно розширюється, моноклональними антитілами. Ці антитіла продукуються специфічними



ми гомогенними популяціями клітин і зв'язують свої молекулярні мішені строго певним чином у певних ділянках молекули. У вересні 2008 р. дослідники повідомили, що їм вдалося виділити функціональні антитіла з крові людей, які пережили пандемію грипу 1918 р., а згодом інша група вчених повідомила, що розробила техніку швидкого клонування антитіл до вірусу грипу, отриманих з крові щойно вакцинованих пацієнтів. Учені сподіваються, що їхні результати дадуть поштовх розвитку терапії «пасивної імунізації». Ринок моноклональних антитіл є найбільшим сегментом фармацевтичної індустрії, що швидко розвивається. У 2007 р. терапевтичні моноклональні антитіла принесли біотехнологічним компаніям США понад 26 млрд. дол. прибутку, основна частина якого припадала на терапію онкологічних і аутоімунних захворювань. Того ж року 50 біотехнологічних компаній розпочали клінічні випробування своїх протираккових моноклональних антитіл у медичних центрах у всьому світі. Ця галузь біотехнології пройшла довгий шлях з того часу як було проведено першу імунізацію хворих людей сироваткою крові коней, що зазнали контакту з тим самим вірусом. Такі ін'єкції були небезпечні, й існував ризик розвитку так званої «сироваткової хвороби», спричиненої імунною реакцією на протеїни, що містяться у крові коней. Коли з'явилися антибіотики, терапія за допомогою сироватки крові тварин була здебільшого забута. Нещодавні досягнення в отриманні антитіл вдихнули нове життя в ідею пасивної імунізації, цього разу людськими антитілами. «Дослідження інфекційних захворювань пройшли повний цикл», — зазначив Ендрю Чан (Andrew Chan), керівник відділу імунології та інжинірингу антитіл компанії Genentech (Сан-Франциско, США). Базову техніку розроблення моноклональних антитіл було створено багато років тому, але зі зростанням ринку компанії дедалі більше модифікували ці методи, аби подолати технічні складнощі й отримати необхідні

патенти. «Маленькі біотехнологічні компанії намагаються знайти нові методи роботи, які б не порушували вже існуючих прав інтелектуальної власності, що дає їм серйозний стимул для інновацій», — зазначає імунолог Джеймс Кроув (James Crowe) з Медичного центру при Університеті Вандербілта у США. Утім, ізолювання антитіл від імунованих пацієнтів має свої обмеження. Дослідники, наприклад, не можуть імунізувати пацієнтів проти раку або інфекційної хвороби, для яких не існує зареєстрованих і дозволених до клінічного застосування вакцин. І, додає Кроув, «вам не прийде в голову імунізувати когось проти штаму грипу, що існував у 1918 році». Як би там не було, люди, які вижили в ту епідемію, можуть нести специфічні антитіла, ефективні проти інших штамів вірусу, який з'явиться у майбутньому. Інші дослідники ізолювали антитіла з лімфоцитів людей, які переохворіли так званим пташиним грипом (вірус H5N1). Теоретично такі антитіла можуть бути протестовані для використання в терапії, але насправді процедура одержання антитіл більш трудомістка і дорога порівняно з виробництвом невеликих молекул. Зараз існує тільки один зареєстрований препарат на основі моноклональних антитіл проти інфекційного захворювання (комерційна назва: MedImmune's palivizumab), який застосовують для елімінації респіраторного синцитіального вірусу в дітей. Palivizumab щорічно приносить понад 1 млрд. дол. прибутку біотехнологічній компанії в Гейтерсбургі (штат Меріленд), проте деякі інші, ще не зареєстровані препарати обіцяють стати прибутковішими. Висока специфічність антитіл є дуже важливою для клініки, проте може виявитися «палицею на два кінці» і бути швидше недоліком, чим перевагою, враховуючи високу мінливість інфекційних агентів, наприклад ВІЛ. «Ми неначе знов відкриваємо для себе великі молекули, такі як моноклональні антитіла, у боротьбі з інфекційними захворюваннями, — пояснює Чан, — однак поки що ця галузь залишається дуже обмеженою». Деякі компанії вельми обережні із запуском клінічних випробувань моноклональних антитіл після подій 2006 р., коли тепер уже неіснуюча німецька компанія TeGenero проводила випробування препарату під назвою TGN1412, який замість того, щоби пригнічувати активність імунокомпетентних клітин, навпаки, активував їх. У результаті ледве не загинули шість добровольців. Антоніо Ланцавеччіа (Antonio Lanzavecchia) з Інституту біомедич-

них досліджень у Швейцарії вважає, що антитіла, вироблені в організмі імунованих людей, можуть також застосовуватись як інструмент для фундаментальних досліджень, і що цей підхід стане шляхом до отримання нових вакцин.

*За матеріалами сайту:  
<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3276>*

### **Пріони «проходять» через міжвидові бар'єри**



Дослідники з Техаського університету вважають, що їхнє відкриття може бути використано як зручний тест для визначення, чи може даний конкретний тип пріона передаватися через міжвидові бар'єри. Пріонові протеїни, як відомо, є відповідальними за розвиток таких станів, як хвороба Кройцфельда-Якоба та губчастий енцефаліт великої рогатої худоби. Вони також виявили, що в разі передавання пріона від одного виду до іншого виникає і новий тип пріона. «Це вельми тривожно, — говорить Клаудіо Сото (Claudio Soto), керівник дослідження, результати якого опубліковано в журналі Cell, — оскільки світ пріонів може виявитись набагато багатшим, ніж ми припускали». Нормальний пріоновий протеїн, так званий PRP, часто виявляють у деяких тканинах організму, переважно в нервовій. Його функції досі не з'ясовано, хоча їх пов'язують з передаванням сигналу, іонним транспортуванням, а також із продукуванням клітин крові. Протеїн може набирати змінених патологічних форм, які спричинюють захворювання. Такі видозмінені протеїни, стійкі до деградації, зв'язують нормальні протеїни і також їх видозмінюють. З часом протеїни з порушеною конформацією формують волокнину в нервових клітинах, що призводить до нейродегенерації і, врешті-решт, до смерті пацієнта. Звичай пріони видоспецифічні або в крайньому разі передаються між близькими видами.

Але іноді вони переступають через міжвидові й міжродові бар'єри. Так, пріони, спочатку виявлені у корів, мають здатність інфікувати людину. Зараз учені намагаються знайти причину так званого синдрому хронічної втоми, який передається також від великих копитних тварин людині. Є підозра, що етіологія цього захворювання пов'язана з пріонами. Оскільки всі пріонові захворювання мають тривалий латентний період, завжди дуже складно передбачити, наскільки інфекційним є той чи інший тип пріона. «На даний момент ми не можемо передбачити, наскільки істотні для даного пріона міжвидові межі, просто знаючи амінокислотну послідовність цього протеїну», — зауважив Сото. У його лабораторії було розроблено метод, аналогічний полімеразній ланцюговій реакції для ДНК, ампліфікації і вивчення структури пріонів. Ця циклічна реакція дозволяє ампліфікувати пріоновий протеїн, починаючи з його кількісних слідів в екстракті здорового мозку. У серйозному дослідженні Сото і його колеги показали, що пріони хом'яків можуть видозмінювати пріонові протеїни мишей, і навпаки. Відомо, що *in vivo* пріонові захворювання можуть передаватися від хом'яків мишам, проте з дуже низькою вірогідністю, і симптоми виявляються через роки після зараження. «*In vitro* цей бар'єр був пройдений за кілька тижнів, — пояснює Сото, — таким чином, наш метод дуже прискорює процес, що відбувається в реальному житті». Пріонові протеїни стають інфекційними без участі будь-яких мутацій і зміни їхньої амінокислотної послідовності. Для кожного нового пріона можна продемонструвати нові властивості, що й уможливорює їх міжвидове передавання. У PRP є тільки одна правильна конформація і безліч неправильних, які спричиняють патологічні процеси. У цьому дослідженні було показано утворення різних форм пріонів, що ушкоджують під час ін'єктування тварин різні ділянки мозку і мають різну стійкість до протеолітичних ферментів. Тобто, фактично в одному зараженому організмі можуть виникати різні типи пріонового протеїну. Сото і його група планують з'ясувати причини, за якими той чи інший пріон може передаватися людині. Тільки знання про подібні механізми уможливають відкриття методу лікування або профілактики пріонових хвороб.

За матеріалами сайту: <http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3271>

## Змінити долю клітини

Після того як було успішно проведено першу в світі операцію клонування, дослідники почали наполегливо розробляти різну техніку, що дає змогу повернути термінальні диференційовані клітини до ранніх етапів розвитку. Нещодавні відкриття, опубліковані в журналі *Nature*, суперечать догмам молекулярної біології, а тому потребують повторного перегляду цього питання. Народження 1997 р. вівці Доллі було доказом того, що цитоплазма яйцеклітини ссавців може репрограмувати ядро будь-якої спеціалізованої соматичної клітини таким чином, що воно зможе дати початок ядру будь-якої іншої соматичної клітини. Через три роки напруженої роботи за допомогою техніки перенесення ядер соматичних клітин було клоновано першу лінію ембріональних стовбурових клітин (ЕСК), що підтвердило зміни властивостей ядра у процесі перенесення ядра соматичної клітки в ооцит. Нова клонована клітина має властивості плюрипотентності й здатна до необмеженої проліферації як звичайні ембріональні клітини. Згодом ЕСК було одержано з нейронів та клітин крові, і після цього вже не залишилося сумнівів у тому, що фактори цитоплазми яйцеклітини можуть повністю змінювати процеси, що відбуваються в ядрах термінальних диференційованих клітин. На той час ідея про те, що такий самий результат можна одержати без використання яйцеклітин, була практично нездійсненна, однак її вже кілька разів блискуче реалізовано. За допомогою внесення до клітини генів, що кодуєть певний набір факторів транскрипції, різні типи клітин миші, а також фібробласти людини було повернено у «стовбуровий» стан. Природно, перед дослідниками у процесі пошуку специфічних типів клітин для потреб регенеративної медицини постало питання, наскільки взагалі необхідні плюрипотентні клітини. Час очікування в цьому випадку дуже великий: диференціювання в умовах лабораторії плюрипотентної клітини, наприклад у нейрон, може тривати місяці, а в деякі інші типи клітин — значно довше. Можливо, існує набагато економніший метод трансдиференціювання одного типу соматичних клітин в інший, минаючи плюрипотентний стан, аби ефективно і швидко забезпечувати пацієнтів необхідним клітинним матеріалом для лікування діабету, наслідків інфарктів або хвороби Паркінсона. У цьому зв'язку закономірним є питання: чи може диференційована клітина

однієї тканини бути репрограмована так, аби стати диференційованою клітиною іншої тканини?

#### *Короткий шлях до бета-клітин*

На конференції Міжнародного товариства досліджень СК (ISSCR) директор Гарвардського інституту стовбурової клітини Дуг Мелтон (Doug Melton) розповів про дослідження, результати яких свідчать про можливість такого шляху. Використовуючи техніку, схожу з тією, що була застосована для одержання перших індукованих плюрипотентних клітин, наукова група під керівництвом колеги Мелтона Ксяо Джу (Qsiao Zhou) отримала з екзокринних клітин підшлункової залози, що секретують травні ферменти, бета-клітини, які продукують інсулін. Останні становлять вельми невеликий відсоток клітин органа і їх завжди недостатньо для трансплантацій пацієнтам, які хворіють на діабет, тоді як на інші припадає до 95% маси залози. Із цієї причини одержання одних клітин з інших є еквівалентним отриманню золота з вугілля. Гарвардські дослідники проаналізували дані літератури стосовно відомих факторів транскрипції, що функціонують у клітинах мишей, послідовно скоротивши їх кількість від відомих 1400 до дев'яти, які могли бути важливими для підтримання функцій бета-клітин. Використавши для доставлення генів цих факторів в екзокринні клітини підшлункової залози миші, ретровіруси, як зазначає Мелтон, «виявили нові інсулінпродукуючі клітини поза їх нормальним розташуванням у так званих острівцях Лангерганса». «Ці клітини не виглядали як бета-клітини і не нагадували їх. Вони дійсно були бета-клітинами», — стверджує Мелтон. Урешті-решт з'ясувалося, що такого результату можна домогтись, вносячи до клітин тільки три гени факторів транскрипції: *Pdx1*, *Ngn3* і *MAFA*. Клінічне застосування цього відкриття — справа далекого майбутнього, і не лише через генну терапію: річ у тім, що отримані вченими клітини, очевидно, не реагують на зміни концентрацій глюкози. Проте, коли мишам індукували діабет, ін'єктувавши препарат, що запускає загибель бета-клітин, а після цього внесли до клітин їхньої підшлункової залози три вказані гени, в організмі їх починалося продукування інсуліну, що призводило до зниження рівня глюкози в крові.

#### *Зміна кількості клітин*

Експерименти в лабораторії Мелтона, в яких було продемонстровано, що маніпулювання геномом диференційованої кліти-

ни може змінювати її якості, не були першими: існують більш ранні роботи, що свідчать про можливість отримання ендокринних клітин з екзокринних. Можливо, найвідоміший приклад датується 80-ми роками, коли Гарольд Вайнтрауб (Harold Weintraub) із Центру досліджень раку Фреда Хатчінсона в Сієтлі показав, що трансфекція ДНК фібробластоподібних клітин, яка кодує фактор транскрипції MYOD, характерний для м'язових клітин, зумовлює трансдиференціювання фібробластів у м'язові клітини. Згодом інші дослідники встановили, що делеція або деплеція одного фактора транскрипції спричинює набуття В-лімфоцитами характеристик Т-клітин або макрофагів, відповідно. Але такими прикладами можуть бути не лише клітини крові та м'язів. Гіперекспресія гена ще одного фактора транскрипції може змінити шлях диференціювання нейрональних стовбурових клітин, унаслідок чого вони дають початок олігодендроцитам. Однак в основі всіх цих конверсій лежать поодинокі фактори транскрипції, чий могутній вплив на стан клітин вже був відомий з досліджень на клітинах мутантів; робота ж, проведена в лабораторії Мелтона з конверсії екзокринних клітин у бета-клітини, — набагато серйозніший крок. Він ґрунтується на потрібній трансфекції, результат якої дуже складно виявити в роботах на клітинах мутантів. «Не можна отримувати мутації одночасно в трьох генах», — наголошує Мелтон. Експерименти в його лабораторії мали велике значення, але потребували деяких припущень. Ті, хто ознайомився з відкриттями групи Мелтона, які незабаром буде опубліковано в *Nature*, називають їх визначним кроком уперед. «Знайти комбінацію, що дозволяє запустити трансдиференціювання багатьох клітин, окрім бета-, і навчитися відновлювати їхні втрачені функції, — це, гадаю, було дуже вражаюче», — зазначив Кен Зарет (Ken Zaret), який очолює програму з епігенетики і клітин-попередників у Центрі досліджень раку Фокс Чейз (США, штат Пенсільванія). Проте, на думку Роберта Тьяна (Robert Tjian), директора Центру стовбурової клітини Каліфорнійського університету в Берклі, «це є експеримент з чорним ящиком. Ви берете цей чорний ящик, б'єте його щосили молотком з одного боку і щось вилітає з нього з другого. Але що відбувається у цей момент усередині ящика — про це ви не маєте жодного уявлення. Скільки етапів вислизає від вашої уваги?».

*Специфічна клітинна транскрипція*

Низька ефективність одержання з фібробластів індукованих плюрипотентних клітин (у кількості сотих і тисячних відсотка) і тривалість цієї процедури (близько місяця) вказують на те, що окрім факторів транскрипції є інші механізми, відповідальні за цей процес. Багато які з цих можливих регуляторів досі не вдалось ідентифікувати. Наприклад, більшість РНК-транскриптів у клітинах ссавців не кодують ніяких протеїнів і невідомо, які функції вони виконують (можливо, регуляторні). Тянь виявив ще один регулятор визначення долі клітини, принаймні для м'язових клітин. Він віднайшов, що в процесі спеціалізації клітини відбуваються послідовні зміни у факторах, що забезпечують процес транскрипції, — масивному, мультисубодиничному комплексу ферменту РНК-полімерази та інших протеїнів, які розкручують подвійну спіраль ДНК і синтезують на основі кодувальної нитки РНК-копію (матричну РНК). Це стало несподіванкою навіть для Тяня, оскільки «машину транскрипції» довгий час вважали незмінною й інваріантною щодо видів і клітинних типів. На щорічній конференції в Лабораторії Колд Спрінг Харбор у Нью-Йорку Тянь повідомив про своє спостереження, яке свідчить, що в міру диференціювання попередниці м'язової клітини з міобласту, що швидко ділиться, у термінальну диференційовану міофібрилу відбуваються зміни в конформації і взаємному розташуванні субодиниць апарату транскрипції. Іншими словами, коли клітина набуває нової якості, за якої одні набори генів активуватимуться, а інші будуть пригнічені, деякі субодиниці перестають працювати і від'єднуються від комплексу. Така зміна, вважає Тянь, може мати сильний — і необоротний — вплив на експресію генів, стабілізуючи стан клітин. Це може, у свою чергу, частково пояснити, чому репрограмування фібробластів в індуковані плюрипотентні клітини таке неефективне: техніка репрограмування привносить у клітину необхідні фактори транскрипції, не забезпечуючи їх відповідним апаратом транскрипції. На цей час краще, хоча й не повністю, відома робота ензимів — в основному ДНК-метилаз і гістонмодифікуючих ензимів, які, приєднуючи або відщеплюючи специфічні хімічні групи (епігенетичні маркери) від хроматину, стабільно активують або пригнічують транскрипцію генів. Наприклад, два великі протеїнові комплекси — Polycomb і Trithorax — конкурують один

з одним за метилування різних амінокислотних положень у гістонових протеїнах, які структурують ДНК у хромосомах. Також кожен із цих комплексів може відщеплювати метильні групи, приєднані іншим комплексом.

*Непостійні маркери*

За відсутності сигналів відміни (наприклад, з боку факторів транскрипції), епігенетичні маркери передаються в ході послідовних мітотичних поділів. Без існування епігенетичної пам'яті кожна клітина, що ділиться, не була б здатна виконувати функції, успадковані від материнської клітини. Деякі епігенетичні маркери залишаються навіть після «грубого» репрограмування, зумовленого перенесенням ядра. В експериментах, результати яких опубліковано у 2008 р. в журналі *Nature Cell Biology*, Рей Кіт Нг (Ray Kit Ng) та його колега Джон Гордон (John Gurdon) з Кембриджського університету виявили конкретну область генома, що асоціюється з геном, який високоспецифічно експресується на ранніх стадіях розвитку м'язових клітин і зберігає «активний» набір епігенетичних міток. Вони також простежили експресію цього гена в ембріонах, отриманих після двох послідовних операцій із перенесення ядра соматичної клітки в ооцит. Очевидно, епігенетичні патерни стабільні самі по собі і мають стабілізуючий ефект, але все ж таки не є незмінними, тимчасом як епігенетичні маркери підтримують стан клітини, фактори транскрипції, чиї ДНК-специфічні взаємодії з хроматином визначають активність епігенетичних маркерів і можуть визначати долю клітин. «Модифікація хроматину може прискорити процес репрограмування, але, мабуть, специфіка цього процесу залежить від ДНК-зв'язувальних факторів транскрипції», — вважає фахівець із молекулярної біології Рік Янг (Rick Young) з Інституту Уайтгед в Кембриджі, штат Массачусетс (США). Янг зазначає, що «в нашому геномі закодовано близько 1 500 подібних факторів — це становить 7% нашої кодувальної ДНК». Природно, після того як буде з'ясовано взаємодії різних факторів транскрипції, що змінюють і підтримують стан клітини, у роботі з трансдиференціювання одних клітинних типів в інші залишиться менше місця для припущень. Та навіть у нормі процес диференціювання виглядає вельми туманним. На думку Янга, існує не так багато ґрунтовно вивчених програм диференціювання *in vitro* від ЕСК до



диференційованих клітин, які у перспективі можуть бути корисними для клітинної терапії. Як би там не було, фактори транскрипції, що беруть участь у цих процесах, добре відомі принаймні для одного типу клітин — моторних нейронів, і в лабораторіях Янга, Зарета і Тьяна зараз ведуться роботи над іншими клітинними лініями, такими як гепатоцити, дофамінергічні нейрони, міоцити скелетної та серцевої мускулатури.

#### *Більше, ніж ідентифікація*

Для аналізу долі клітини має значення не тільки ідентифікація ключових факторів транскрипції. Також дуже важливими є знання про те, яка кількість фактора транскрипції і в який момент клітинного циклу має залучитись у процес. Ігор Лемічка (Igor Lemischka), директор Інституту стовбурової клітини у Нью-Йорку, відзначає, що, додаючи одні й ті самі фактори транскрипції у трьох різних співвідношеннях, можна одержати три різні типи диференційованих клітин. Чи існують якісь принципові обмеження в репрограмуванні? «Я не знаю, наскільки це буде складно, — зазначає Лемічка, — сьогодні можна сказати, що деякі успішні випадки отримання з клітини-А клітини-Б не можуть розцінюватись як одержання клітин, що не відрізняються від їхніх природних аналогів». Тим часом повернення фібробластів шкіри в плюрипотентний стан є малоефективним і потребує тижнів культивування *in vitro*, трансдиференціювання екзокринних клітин підшлункової залози в бета-клітини — процес набагато швидший і ефективніший. Він триває менше тижня і при цьому близько 20% трансфікованих клітин стають функціональними бета-клітинами. Навіть якщо експресія внесеного вірусного вектора припиняється протягом місяця, її ефект зберігається більше шести місяців і може залишатися постійним. Мелтон вважає, що з упевненістю говорити про це поки ще зарано. Успіх з конверсією інсулінпродукуючих клітин нашттовхнув Мелтона на думку про схожі експерименти з конверсії клітин інших органів, наприклад мозку. «При деяких нейродегенеративних розладах, — говорить Мелтон, — нейрони руйнуються, тоді як сусідні підтримувальні клітини — астроцити і глія — залишаються абсолютно здоровими». На додаток до цього він зазначає: «Печінка людини чудово регенерує. Якщо ми зможемо отримати бета-клітини з гепатоцитів, це буде справжнім проривом». Паралельно із цими дослідженнями Мелтон і багато інших учених вирішу-

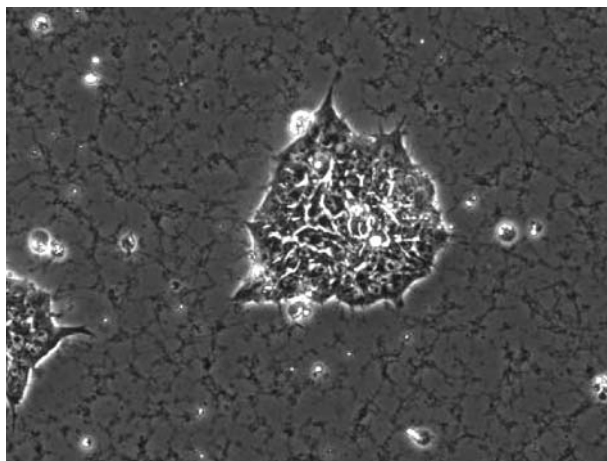
ють проблему, яка має бути розв'язана перш ніж які-небудь штучно трансдиференційовані клітини будуть доступні для клінічного застосування: випадкове вбудовування ретровірусів, використовуваних для трансфекції, у геном клітини-реципієнта, зі створенням химерних і потенційно онкогенних ДНК. Дослідники упевнені, що вирішення цієї проблеми шляхом створення невеликих молекул, аналогічних факторам транскрипції, або генерування позаклітинних сигналів, що модулюють їхню активність, рано чи пізно буде знайдено.

*За матеріалами сайту:*  
<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3270>

#### **Чому гинуть трансплантовані інсулінпродукуючі клітини?**



Результати нового дослідження можуть підвищити ефективність трансплантацій клітин підшлункової залози, що проводяться для терапії діабету типу I. Трансплантація інсулінпродукуючих бета-клітин так званих острівців Лангерганса підшлункової залози — поширений метод лікування діабету типу I (інсулінозалежного). Проте час життя цих клітин в організмі реципієнта незначний, і невдовзі пацієнтові потрібна повторна трансплантація. Дослідники з двох шведських університетів: Університету міста Лінкєпінг і Упсальського університету в нещодавньому дослідженні виявили накопичення у трансплантованих бета-клітинах протеїнових агрегатів, так званих амлоїдом, що, найімовірніше, і є причиною загибелі клітин. Дотепер було незрозуміло, чому припиняється продукування інсуліну в трансплантатах, хоча історія операцій з трансплантації налічує вже близько 30 років. Тепер, можливо, дослідження терапії діабету типу I отримають новий напрям. Сотні пацієнтів у всьому світі потребують трансплантації клітин підшлункової



лЕСК, що їх вирощують на матригелі в живильному середовищі

бути замінений на полі-D-лізин (синтетичний позаклітинний матрикс). Переваги полі-D-лізину перед матригелем — його штучне походження, простота у використанні, а також незмінювані якості. Розпочавши свою кар'єру в Японії, Сато потім продовжив вивчення біології СК у The Rockefeller University, в Нью-Йорку — одному з найбільших дослідницьких центрів у світі. У 2006 р. він став завідувачем кафедри біохімії і приєднався до проекту дослідження СК Ніколь Харб (Nicole Harb) і Тревора К. Арчера (Trevor K. Archer) з National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). Мета цього проекту — детальне вивчення механізмів, що лежать в основі властивостей плюрипотентних стовбурових клітин, та розроблення підходів до використання цих механізмів у клінічній практиці. Зараз наукова група сфокусувала свою увагу на техніці одержання індукованих плюрипотентних клітин, які штучним шляхом отримують із диференційованих клітин дорослого організму без використання ембріонів. Сато вважає, що такі клітини можуть бути з великим успіхом застосовані в клінічній практиці, і ставить собі за мету отримати лінії, що культивуються на полі-D-лізині у безсироваткових живильних середовищах (оскільки використовується під час культивування клітин сироватка також має тваринне походження).

*За матеріалами сайту:  
<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3263>*

## Підвищення проліферації стовбурових клітин крові в культурі

Пацієнти, які хворіють на лейкемію, з деякими аутоімунними захворюваннями та генетичними порушеннями, що призводять, наприклад, до серпоподібно-клітинної анемії, потребують трансплантацій гемопоетичних СК (ГСК) кісткового мозку або пуповинної крові. Проте у зв'язку з обмеженістю кількості цих клітин ефективність терапії може істотно знижуватися. Дослідники з Whitehead Institute for Biomedical Research (Великобританія) знайшли спосіб, за допомогою якого можна істотно (майже у 20 разів) збільшити кількість ГСК, одержаних з пуповинної крові в культурі. Це може стати серйозною альтернативою трансплантації кісткового мозку. Клітини пуповинної крові легко отримувати, і ця процедура не є інвазивною. Кріоконсервація дозволяє зберігати їх скільки завгодно. Професор біології Харві Лодіш (Harvey Lodish), який брав участь у роботі, говорить, що його групі вдалось ідентифікувати п'ять ростових факторів, за допомогою яких можна



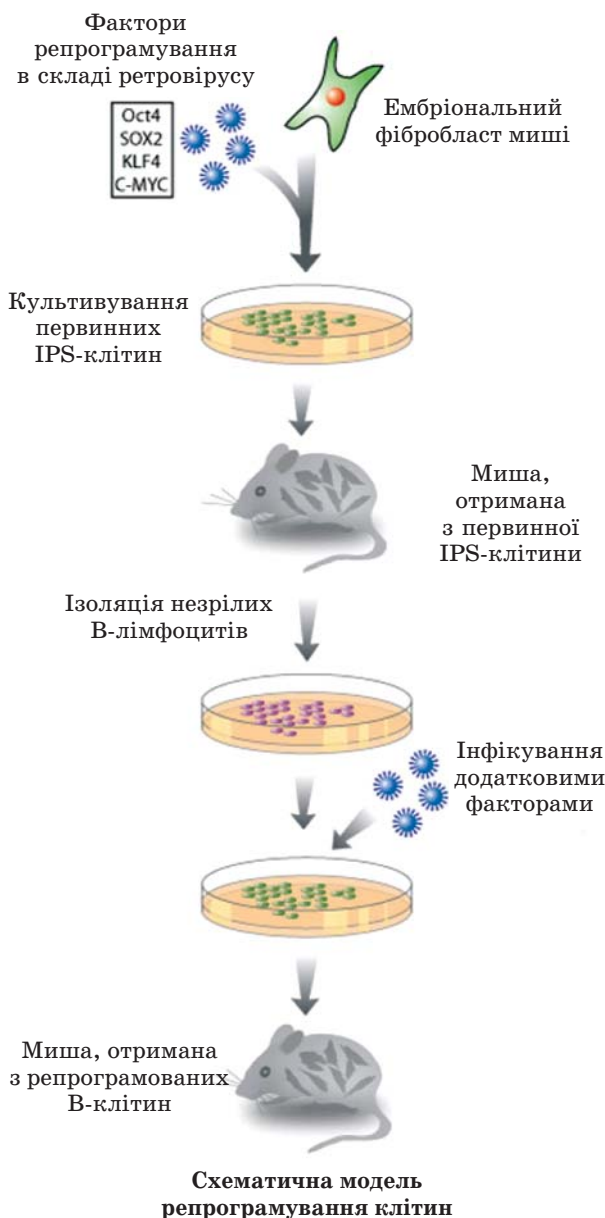
стимулювати поділ СК крові людини в культурі. Три фактори було виділено раніше. Це SCF (Stem Cell Factor), TPO (тромбопоетин) і Flt3-ліганд. У своїй останній роботі дослідники описали ще два фактори росту: angiopoietin-like 5 і IGFBR2. Раніше було дуже складно збільшити кількість ГСК у культурі, оскільки клітини починали швидко диференціюватися. Проте зазначені фактори за їх одночасного застосування запобігають диференціюванню, дозволяючи клітинам продовжувати проліферувати зі збереженням їхніх властивостей. Учені перевірили ефективність застосування таких клітин під час трансплантації мишам з експериментально індукованим імунодефіцитом і встановили, що вони зберігають

здатність відновлювати кровоносну систему реципієнта. Дослідники також вважають, що це відкриття може стати основою для генної терапії захворювань крові. Власні ГСК пацієнта після генетичної модифікації і виправлення дефекту, що призвів до захворювання, можуть бути розмножені в культурі та ін'єктовані йому ж після проведення адекватної хіміотерапії.

За матеріалами сайту:  
<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3239>

### Зрілі В-клітини можуть бути повернені у «стовбуровий» стан

Повністю зрілі, термінально диференційовані В-лімфоцити можна репрограмувати й повернути у стан, що нагадує ембріональні стовбурові клітини. Це було виявлено дослідниками з Whitehead Institute for Biomedical Research (Великобританія). Раніше було показано, що так звані індуквані плюрипотентні клітини (IPS, від induced pluripotent cells) можна отримати з фібробластів шкіри. Оскільки фібробласти не є термінальними диференційованими клітинами і в нормі диференціюються в інші клітини шкіри, з них принципово не так складно отримати «стовбурові» клітини. В-клітини — це імунокомпетентні клітини, яким притаманна здатність розпізнавати чужорідні антигени, а також продукувати специфічні антитіла. Із завершенням диференціювання В-лімфоцитів частина їх ДНК безповоротно втрачається. Тому одержані з них «стовбурові» клітини, як пояснив керівник дослідження Якоб Ганна (Jacob Hanna), легко визначити за відсутністю певної частини генома. Рудольф Дженіш (Rudolf Jaenisch), завідувач лабораторії, в якій працює Ганна, зазначив, що «це може дозволити перенесення в чашку Петрі складного генетичного захворювання і стати серйозним кроком у вивченні його патогенезу». Ученим удалося отримати з В-лімфоцитів IPS-клітини тим самим методом, що й з фібробластів шкіри, тобто внесенням за допомогою ретровірусної трансфекції в ДНК клітин генів *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* і *Klf4*. Проте в разі В-клітин був потрібен ще один додатковий фактор: ССААТ/енхансерзв'язувальний протеїн альфа (ССААТ/enhancer-binding-protein-alpha-C/EBPalpha). Як й IPS-клітини з фібробластів, IPS-клітини з В-лімфоцитів можна використовувати для одержання



цілісних організмів. Так, вдалося отримати з них ембріони мишей, у всіх клітинах яких не було фрагмента ДНК, що відсутній у В-клітинах. Ця робота достатньо переконливо продемонструвала, що, по суті, репрограмування можуть бути піддані клітини будь-якого типу. Згодом результати її можна буде використовувати для адекватного моделювання на тваринах найрізноманітніших захворювань.

За матеріалами сайту: <http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3238>

Матеріал підготував  
д. б. н. Є. Л. Левицький