

Нервные клетки — восстанавливаются!

(Окончание. Начало на стр. 4)

«Теперь совершенно очевидно, что все клетки нервной системы происходят из малодифференцированных — так называемого нейроэпителия. То есть существует такая своеобразная клетка-мать, которая во время своего развития дает множество дифференцировок, продуцируя «детенышей» разных типов, а затем переходит в другую форму и становится стволовой клеткой взрослого мозга. Теперь у нее есть свои новые функции, но при этом она помнит, что когда-то была нейроэпителием, и способна продуцировать нейроны в специфических нишах, где они концентрируются», — рассказывает Мария Александрова.

Хорошо исследованы стволовые клетки, расположенные в гиппокампе и прилежащей к нему зоне головного мозга. Сейчас волнует, как управлять их дифференциацией. Есть огромный набор сигналов, но ученые не знают, какие из них (скорее всего не индивидуально, а в комплексе) ответственные за эти процессы. Более того, уже достаточно очевидно: стволовые клетки не обеспечивают реге-

нерацию за пределами своих зон компетенции. Есть работы, показывающие, что в случае достаточно сильного повреждения они, конечно, способны отклониться от обычного пути миграции и прийти в место, где требуется помощь, но дальнейшая их судьба там неизвестна.

Однако исследователи не оставляют попыток. «Мы предлагаем использовать стволовые клетки, которые можно содержать в культуре, как способ стимулирования регенерации, доставляя их в любую область центральной нервной системы путем инъекции», — говорит Мария Александрова.

В Институте биологии развития им. Н.К. Коляцова нейральные стволовые клетки трансплантировали в мозг крысам. От гиппокампа они мигрировали в ту область, где находился поврежденный нейрон, и интегрировались с уже имеющимися клетками. Когнитивная функция мозга не сказала чтобы восстанавливалась до нормы, но становилась гораздо лучше по сравнению с результатами других методов лечения. Количественный анализ свидетельствовал о

том, что после трансплантации насчитывалось гораздо больше нормальных нейронов, чем при повреждении. В спинном мозге они также продемонстрировали не очень высокое, но ощутимое влияние на восстановление. Затем эти же клетки ученые подсадили в травмированную сетчатку глаза, и было показано, что они хорошо нормализуют нейронные ответы.

Но если нейральные стволовые клетки оказались столь эффективными, то возникает вопрос, откуда их брать для того, чтобы этот способ терапии был внедрен в медицину? В гиппокампе и в супермолекулярной зоне они присутствуют в недостаточном количестве, но, оказывается, подобные структуры обнаружены в сетчатке глаза — это клетки пигментного эпителия, которые в процессе культивирования могут быть «опущены» до состояния, близкого к плюрипотентному. Молекулярные исследования показали, что клетки из сетчатки выходят в дедифференцировку гораздо быстрее, чем их собратья из неокортекса, и являются гораздо пластичнее сво-

их соседей из переднего мозга.

Однако на пути широкого применения нейральных стволовых клеток стоит другая проблема: непредсказуемость их развития в поврежденном органе. Неизвестно, как они захотят действовать и чем стать. «Ситуация складывается таким образом: да, мы можем полностью охарактеризовать эти клетки в момент культивирования, но как только мы их трансплантируем в патологическое микроокружение, оно начинает влиять на последующую дифференцировку. Например, у человека 20 лет незаметно для него и окружающих развивалась болезнь Паркинсона, и вот она, наконец, обнаружена и, казалось бы, можно делать операцию. Но ведь мозг все это время не стоял на месте — процессы дегенерации в нем всегда чем-то компенсируются, и что делается в той области, куда предполагается пересадить клетки, мы не знаем, — объясняет Мария Александрова. — Нейротрансплантация обязательно нужна, но заранее прогнозировать положительный эффект пока нельзя, ведь сочетание микроокружения патологического мозга и привнесённых стволовых клеток непредсказуемо».

Диана Хомякова



Немного о классификации

Сегодня плюрипотентные клетки — одни из наиболее активно исследуемых объектов биомедицины. Интерес к ним совершенно понятен. Дело в том, что они обладают рядом специфических и поистине выдающихся свойств: во-первых, самообновляемостью (т.е. способностью поддерживать недифференцированное состояние в культуре), а во-вторых — возможностью превращения в любую из тканей взрослого человека или животных.

Самый, пожалуй, популярный на данный момент способ применения таких объектов — регенеративная медицина. Еще одно направление, о котором и шла речь в докладе Сергея Медведева, — создание моделей заболеваний. «На сегодняшний момент существует два типа плюрипотентных клеток человека, которые используются в этом случае, — поясняет ученый. — Это эмбриональные и индуцированные стволовые клетки. В нашем контексте преимущество имеют последние, так как они могут быть получены в любой период жизни пациента».

В свою очередь, этот вид делится на два типа возможных линий. Пациент-специфичные, как следует из названия, в качестве своего «источника» подразумевают, собственно, пациента. Изогенные формируются в лаборатории с помощью специальных манипуляций. По словам Сергея Медведева, и те, и другие имеют свои преимущества и недостатки. «Достоинства первого варианта в том, что он воспроизводит фенотип заболевания, характерный для конкретного больного, и с точки зрения персонализированной медицины подобный подход оптимален, кроме того, такие клетки аутологичны, т.е. могут быть использованы как материал для заместительной терапии, адресованной этому же человеку, — рассказывает биолог. — Однако не всегда возможно найти страдающего тем недугом, что необходимо для исследования, к тому же такие линии не воспроизводят разницу между индивидуумами, все их особенности касаются конкретной персоны. Конечно, всё это сказывается на результатах работы». Проблемы, как говорит ученый, решаются исполнением изогенных клеточных панелей пациент совершенно не нужен, достаточно иметь в лаборатории исходные клет-

Кем быть: сибирские ученые раскрывают потенциал плюрипотентных клеток

Одной из наиболее ярких и горячих тем Всероссийского симпозиума «Новейшие методы клеточных технологий в медицине» является поистине волшебная вещь: не определившись, какую часть организма они в итоге составят, плюрипотентные стволовые клетки. Их изучают, модифицируют и ищут способы применения. Сотрудник лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН кандидат биологических наук **Сергей Петрович Медведев** рассказал, как можно с помощью полученных линий моделировать различные заболевания человека — тяжелые и наследственные.

ки условно здорового человека, чтобы затем, используя специальные методики, создавать те модификации, которые интересуют исследователей.

Инструментальный набор

Методы, с чьей помощью можно строить изогенные клеточные линии, были созданы сравнительно недавно. «Это наука сегодняшнего дня, — подчеркивает Сергей Медведев. — В 2009-м в мире реализовали способ под названием TALENs, а система CRISPR / Cas9 получила свое развитие буквально в прошлом году».

TALENs представляет собой белки, которые состоят из двух основных элементов: ДНК-связывающего и нуклеазного доменов. Первый может быть создан с помощью определенных генно-инженерных способов и метода молекулярного клонирования под необходимую ученым последовательность. «Существует специальный код, благодаря которому можно создавать такие вещи, состоящие из отдельных мономеров. Это полностью развязывает руки исследователю: теперь у нас есть возможность формировать необходимые «режущие» белки», — рассказывает Сергей Медведев. Работают они всегда в паре, т.е. нужно создать две структуры, ориентирующиеся в обстановке и вносящие двухцепочный разрыв.

CRISPR / Cas9 также состоит из двух элементов — некодирующей РНК и нуклеазы Cas9. «Вы создаете первую под ту последовательность, которая является интересной, просто помещая туда набор из двадцати нуклеотидов. Он путем простой комплементарности опознает конкретные участки генома, куда затем нужно поместить тот же самый разрыв», — комментирует ученый.

Зачем же исследователям нужно резать ДНК? Дело в том, что при подобном повреждении клетка начинает его исправлять — репарировать. Одним из механизмов «починки» является негомолотичное сшивание концов. В результате формируются небольшие секции нуклеотидов: таким образом можно выключать гены, разрезая те их места, которые отвечают за функциональность. Причем, подавление работы идет полное, в отличие от метода РНК-интерференции. Кроме того, разрывы могут затягиваться за счет гомологичной рекомбинации — и если добавить в клетку некие донорные молекулы, то она сможет использовать

это в своих целях. То есть, вы помещаете в такую частицу интересующую вас последовательность (например, точечную мутацию), и за счет естественных механизмов идет «вшивание» ее в геном.

Ближе к практике

Один из проектов, ведущийся силами трех организаций (ИЦИГ СО РАН, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е. Н. Мешалкина) с использованием перечисленных инструментов, направлен на создание клеточной модели бокового амиотрофического склероза. Это одна из болезней моторных нейронов, которая заключается в их избирательной гибели.

«Существует несколько типов такого недуга, в частности, наследственные формы, вызванные мутацией в отдельных генах, — объясняет Сергей Медведев. — Наша задача заключается в том, чтобы создать панель изогенных линий на основе эмбриональных стволовых клеток путем внесения точечных изменений в геном. Мы выбрали целый список из 11 вариантов, которые отражают различное поведение определенного белка именно на молекулярном уровне».

Зачем же так много? Дело в том, что в случае нейродегенеративных болезней существует такая проблема: фенотипически картина выглядит одинаково, но если взглянуть на нее более пристально, то ситуации могут оказаться совершенно разными. «Соответственно, не зная самых микроскопических механизмов, вы будете не в состоянии подобрать или создать лекарство, поскольку вы не видите, на какую мишень его ориентировать. Наша цель — создать модели, которые можно использовать для подробных исследований, поиска и тестирования медикаментозной терапии. Клетки, работы по получению которых сейчас ведутся, мы планируем дифференцировать в моторные нейроны и применять последние для масштабных скринингов лечебных соединений», — говорит Сергей Медведев.

Второй проект связан с недугами, вызванными удлинением треклов триплетных нуклеотидных повторов определенных мест генов (самый яркий пример, что называется, «на слуху» — хоррея Хантингтона). Идеей работы, по сло-

вам ученого, является создание панели клеточных линий, которые содержат разную протяженность упомянутых выше структур, путем внесения последних в геном. Таким образом, можно увидеть все возможные варианты.

Наконец, третье направление поможет разобраться с болезнью Альцгеймера, которая становится всё более распространенной, особенно в тех странах, где велика продолжительность жизни. «Сейчас пересматривается парадигма того, что является первопричиной, — комментирует Сергей Медведев. — Долгое время считалось: все дело в накоплении бета-амилоида (пептида, при добавлении двух ферментов приобретающего негативное влияние на организм), но на сегодняшний момент это мнение меняется, так как нашли доказательство — изначально проблема заключается в хроническом воспалении в головном мозге. Так вот, чтобы осуществлять поиск и проверку гипотез, не тратить лишние финансы на поиск лекарств от тех явлений, которых и вовсе может не существовать, мы также создаем наши модели». Ученые намерены сформировать панель из трех мутаций, выражающих соотношения и поведение форм бета-амилоида — это даст то же самое, что и в двух других проектах: варианты соотношения пептида и различные молекулярные механизмы одной болезни. «Мы считаем, что таким образом можно более четко формулировать предположения, отвечать на вопрос, какова мишень для терапии, а затем использовать эти системы для тестирования потенциальных фармсредств и токсикологических исследований уже существующих лекарств», — повторяет Сергей Медведев.

Однако если говорить о стратегической цели консорциума ученых, то она заключается в создании глобального биобанка клеточных моделей заболеваний человека. Он может формироваться разными способами; содержимое должно храниться, быть тщательно охарактеризованным, и, конечно, открытым для использования. «Для эффективной работы по его формированию нам нужно взаимодействовать с медицинскими институтами и учреждениями. Без нашего общего сотрудничества никакого банка сделать будет нельзя», — подчеркивает исследователь.

Екатерина Пустолякова
На фото Д.Хомяковой: С.Медведев.