

Исследование шизофрении *in vitro*: возможности и ограничения

Nicholas J. Bray¹, Shitij Kapur², Jack Price¹

¹ Department of Neuroscience и

² Department of Psychosis Studies, Institute of Psychiatry, King's College London, Великобритания

Перевод: Алфимов П.В. (Москва)

Психические расстройства в целом и шизофрения в частности характерны только для человека. Мысль о том, что шизофрению можно исследовать в чашке с клеточной культурой кажется абсурдной. Тем не менее, достижения в генетике и биологии стволовых клеток, открывают новый биологический смысл исследования этих заболеваний *in vitro*.

В ходе геномных исследований и скрининга на редкие генетические аномалии обнаружено большое число генов, которые могут играть роль в развитии шизофрении и биполярного расстройства. Достижения в сфере стволовых клеток позволили выделить клеточные культуры человеческих нейронов, на которых можно исследовать ряд молекулярных, возрастных и патофизиологических аспектов деятельности головного мозга.

В настоящей работе авторами проведен обзор существующих технологий исследования человеческих клеточных культур и выдвинут ряд теоретических предположений о том, как эти исследования могут помочь в лечении шизофрении и других психических расстройств.

ИММОТАЛИЗОВАННЫЕ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Некоторые популяции нейронов можно напрямую получить у живых субъектов и вырастить их в качестве «первичных» клеточных культур. Этические и практические соображения, как правило, ограничивают использование первичных культур нервных клеток человека в качестве объекта исследования. Многообещающим и потенциально безграничным методом является иммортализация линии нейронов путем удаления из первичной культуры генов-онкосупрессоров (антионкогенов).

В психиатрических исследованиях такие линии клеток можно использовать в качестве моделей для изучения внутриклеточных механизмов действия лекарственных средств, а также для изучения молекулярных и клеточных функций выявленных генов предрасположенности. Это научное направление может оптимизировать существующую психофармакотерапию и помочь в определении новых терапевтических мишеней.

Линии нервных клеток, полученные из опухолей

В течение многих лет исследователи используют опухоли как источник клеточных линий, которые с легкостью воспроизводятся в чашке для культивирования. Некоторые клеточные линии, полученные из опухолей, имеют характеристики человеческих нейронов. В настоящее время наиболее часто используемой линией нейронов является линия SH-SY5Y, исходно полученная из метастазирующей нейробластомы. Эта линия клеток имеет ряд исключительно «нейрональных» особенностей: аксональный рост, синтез нейротрансмиттеров, экспрессия рецепторов и др.

Линия SH-SY5Y широко использовалась для изучения внутриклеточных механизмов действия антидепрессантов и антипсихотиков (1). Эндогенная экспрессия нейронных белков в клетках SH-SY5Y позволяет изучать генетические механизмы предрасположенности и функции различных вариантов последовательностей ДНК, связанных с психическими расстройствами. Например, недавно на экстракте этих клеток показано, что первый вариант ДНК, имеющий «значимую по всему геному» связь с психозом, меняет связывание фактора транскрипции, который регулирует экспрессию гена ZNF804A (2).

Иммортализованные линии стволовых нервных клеток

Опухолевые линии клеток могут иметь общие характеристики с нейронами, однако, они способны «имитировать» далеко не все типы клеток и зачастую обнаруживают серьезные хромосомные аномалии. Стволовые клетки, полученные из мозга эмбриона человека, являются полипотентными (т. е. они могут дать начало широкому диапазону клеточных культур, включая нейроны и глиальные клетки). Такие клеточные линии позволяют более достоверно исследовать физиологию и развитие нейронов. Клональные линии стволовых нервных клеток создаются путем «условной иммортализации», в ходе которой в геном вводится регулируемый ген, отвечающий за деление клетки. Такой подход позволяет контролировать дифференциацию клеток и рост культуры (3).

Получено несколько линий стволовых нервных клеток с нормальным хромосомным набором из различных областей эмбрионального мозга (в т. ч. из коры больших полушарий, гиппокампа и полосатого тела). Как и опухолевые клеточные линии, линии стволовых клеток представляют собой модель для исследования механизмов действия лекарственных средств и определения генов предрасположенности к психическим расстройствам. К примеру, предполагается, что гормон кортизол нивелирует отрицательное воздействие стресса на нейрогенез в гиппокампе. На линии стволовых нервных клеток удалось показать, что антидепрессанты предотвращают этот феномен и восстанавливают нормальную нейрогенную активность (4). Схожая линия клеток из коры больших полушарий использовалась для моделирования патогенетических изменений в экспрессии гена DISC1 (disrupted-in-schizophrenia-1, «ген 1, нарушенный при шизофрении») (5), а также для получения первых данных о молекулярных функциях гена предрасположенности к шизофрении и биполярному расстройству, ZNF804A (6).

НЕРВНЫЕ КЛЕТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ У ПАЦИЕНТОВ

Альтернативным подходом является сравнение клеточного материала, полученного у пациентов и здоровых людей. Клетки пациентов позволяют исследовать патологические процессы, связанные с сочетанным действием всех вариантов генов предрасположенно-

сти у одного индивида. Живые клеточные культуры могут оказаться информативнее трупного материала. В частности, можно изучать отдельные аспекты развития нейронов, имеющие отношение к шизофрении.

Клетки, полученные из обонятельного нейроэпителлия

Слизистая оболочка обонятельной области является источником стволовых клеток, которые можно извлечь с помощью биопсии. Эти клетки можно репродуцировать в виде нейросфер — скоплений стволовых клеток и дифференцируемых нервных клеток-предшественников. В клетках, полученных таким образом у пациентов с шизофренией и здоровых лиц, выявляются отличия в экспрессии генов, связанных с различными процессами развития нейронов, например, с процессами аксонального наведения (7). Кроме того, в клетках обонятельного нейроэпителлия, полученных у пациентов с шизофренией, обнаружены нарушения цикла деления (8).

Индуцированные полипотентные стволовые клетки

Обонятельные нейроэпителлиальные клетки несут в себе все генетические варианты, которые определяют предрасположенность к заболеванию, однако, они не являются идеальной моделью отдельных популяций нейронов, играющих важную роль в развитии психических расстройств (в частности, клеток коры и гиппокампа). Технология индуцированных полипотентных стволовых клеток является большим прорывом в этом направлении.

Представьте, что вы можете определить потенциального пациента с шизофренией *in utero*, за 20 лет до начала заболевания, и выполнить биопсию мозга. Вы сможете выполнить культивирование клеток данного пациента и отследить их патологическое развитие. Технология индуцированных стволовых клеток, представленная в оригинальной статье 2009 г., во многом напоминает описанную ситуацию. Можно взять у пациента первичные соматические клетки (как правило, из кожи), а затем «перепрограммировать» их в полипотентные стволовые клетки, которые могут дать начало клеткам любого типа, в том числе клеткам центральной нервной системы.

В последнее время публикуются отчеты об успешном применении этой технологии на клетках, взятых у пациентов с психическими заболеваниями. Например, Brennand и соавт. (10) взяли кожные фибробласты у пациентов с шизофренией и здоровых лиц, перепрограммировали их, а затем вырастили из этих полипотентных клеток нейроны. При сравнении с клетками из контрольной группы в нейронах пациентов с шизофренией обнаружены изменения в экспрессии генов, связанных с глутаматом и циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ), количестве нейрональных отростков и синаптических связей, а также в передаче сигналов интеграции генов MMTV «бескрылого» типа.

Индуцированные полипотентные клетки представляют собой превосходную модель для изучения развития нейронов *in vitro*, т. к. они позволяют целиком исследовать геном пациента и здорового человека. Недавно показана возможность прямого перепрограммирования фибробластов человека в нейроны («индуцированные нейрональные клетки») (11). Такие клетки представляют собой превосходную модель, на которой можно исследовать клеточную патофизиологию и реакцию на фармакотерапию.

Обе технологии находятся в самом начале пути своего развития. К сожалению, эти клеточные линии получены на ограниченном числе пациентов. Требуется большой объем работы, чтобы определить вариабельность нейрональных культур, а также различия между отдельными пациентами и типами клеток (12). Для того чтобы эти технологии достигли своего полного

потенциала, необходимо использование стандартизированных протоколов и увеличение количества клеточных линий от разных пациентов.

ОГРАНИЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ

Все клеточные модели имеют свои ограничения. Безусловно, линии человеческих нервных клеток могут использоваться для изучения молекулярных и клеточных функций отдельных генов предрасположенности. Тем не менее, эти клеточные линии не позволяют изучить множество подчас взаимодействующих генетических переменных, которые играют роль в развитии сложных психических расстройств. Клеточные линии, полученные у пациентов, позволяют исследовать весь геном. Однако в настоящее время мы не знаем, какие типы клеток в большей степени участвуют в патогенезе и, соответственно, требуют более пристального внимания.

Анализ нескольких типов клеток одного пациента при сравнении с клетками здорового человека, может выявить клеточные популяции, имеющие «заинтересованность» при том или ином заболевании. Нужно отметить высокую стоимость подобных исследований. Технология индуцированных полипотентных/нейрональных стволовых клеток позволяет исключить средовые переменные, мешающие анализу патогенетических механизмов (например, исключить эффекты фармакотерапии). Однако это также приводит к тому, что не учитываются средовые факторы, играющие важную роль в развитии психических расстройств.

В целом можно сказать, что психические расстройства (например, шизофрения) представляют собой производные деятельности всего головного мозга с учетом индивидуального и социального контекста. Клеточные модели могут в какой-то мере прояснить молекулярные и клеточные механизмы психических расстройств, однако, они не являются всеобъемлющими.

ВЫВОДЫ

Клеточные методы в исследовании психических расстройств развиваются в двух основных направлениях. Первое направление — это клональные линии, с помощью которых моделируются клетки центральной нервной системы. На этих линиях изучаются механизмы действия лекарственных средств и определяются гены предрасположенности к психическим расстройствам. Это направление может в недалеком будущем помочь разработать новые методы психофармакотерапии. Другое направление — это клетки, полученные в популяциях пациентов и здоровых лиц. Они используются для изучения «в реальном времени» патологических процессов, в основе которых лежат различные варианты генов предрасположенности. Протоколы изучения индуцированных нервных клеток в настоящее время бурно развиваются. Их доступность и очевидная валидность гарантируют то, что они обретут популярность среди фармкомпаний и академических учреждений.

Безусловно, клеточные модели не могут охватить всей сложности психических заболеваний. Тем не менее, исследования определенных типов нервных клеток в крупных когортах пациентов в недалеком будущем может дать новые сведения о биологических механизмах психических расстройств и предоставить модели для разработки и тестирования новых методов лечения.

Литература:

1. Park SW, Seo MK, Cho HY et al. Differential effects of amisulpride and haloperidol on dopamine D2 receptor-mediated signaling in SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology* 2011;61:761-9.

2. Hill MJ, Bray NJ. Allelic differences in nuclear protein binding at a genome-wide significant risk variant for schizophrenia in ZNF804A. *Mol Psychiatry* 2011;16:787-9.
3. Pollock K, Stroemer P, Patel S et al. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol* 2006;199:143-55.
4. Anacker C, Zunszain PA, Cattaneo A et al. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol Psychiatry* 2011;16:738-50.
5. Kobayashi NR, Sui L, Tan PS et al. Modelling disrupted-in-schizophrenia 1 loss of function in human neural progenitor cells: tools for molecular studies of human neurodevelopment and neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 2010;15:672-5.
6. Hill MJ, Jeffries AR, Dobson RJ et al. Knockdown of the psychosis susceptibility gene ZNF804A alters expression of genes involved in cell adhesion. *Hum Mol Genet* 2012;21:1018-24.
7. Matigian N, Abrahamsen G, Sutharsan R et al. Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *Dis Model Mech* 2010;3:785-98.
8. Fan Y, Abrahamsen G, McGrath JJ et al. Altered cell cycle dynamics in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2012;71:129-35.
9. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
10. Brennand KJ, Simone A, Jou J et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;473:221-5.
11. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 2011;476:220-3.
12. Brennand KJ, Gage FH. The promise of human induced pluripotent stem cell-based studies of schizophrenia. *Stem Cells* 2011;29:1915-22.