

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 42–8.
2. Glennie S, Soeiro P, Dyson P.J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005; 105(7): 2821–7.
3. Aggarwal S, Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; 105(4): 1815–22.
4. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness.

Blood. 2005; 105: 2214–9.

5. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99: 3838–43.
6. Krampfer M, Cosmi L, Angeli R. et al. Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006; 24: 386–98.
7. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P. et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 783–91.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Haniffa M., Wang X.-N., Holtick U. et al. *Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells. The Journal of Immunology* 2007; 179: 1595–604

Клетки костного мозга мигрируют в места локализаций новообразований и приобретают фенотип опухолевых клеток

В настоящее время получены убедительные доказательства, что стволовые/прогениторные клетки костного мозга взрослых могут мигрировать в удаленно расположенные органы [1, 2]. В нормальных условиях миграция клеток костного мозга, по-видимому, не играет какой-либо существенной функциональной роли, тогда как при некоторых патологических состояниях может иметь большое значение. Ранее было продемонстрировано, что клетки костного мозга мигрируют в очаги повреждений и/или воспаления, что опосредовано градиентами концентраций некоторых ассоциируемых с воспалением хемокинов [3, 4]. Роль, которую играют мигрирующие клетки в очаге воспаления, остается предметом дискуссий. Благодаря секреции цитокинов, дифференцировке в необходимые клеточные типы или клеточному слиянию они могут способствовать репаративной регенерации.

Houghton J. et al. предположили, что мигрирующие в очаги хронического воспаления клетки костного мозга могут предрепавать злокачественную трансформацию и служить источником новообразований. В опубликованной ими работе в журнале *Science* они использовали облученных мышей, которым трансплантировали меченые клетки костного мозга [5]. Позднее, животные инфицировались хеликобактером *Felix*, в результате чего у мышей развивались очаги хронического воспаления в слизистой оболочке желудка, которые прогрессировали до рака. В течение 20 недель после инфицирования меченые клетки костного мозга мигрировали в очаги воспаления в слизистой оболочке желудка. Здесь они дифференцировались и приобретали морфологию эпителиальных клеток, при этом сохраняя маркеры клеток костного мозга. Меченые дифференцированные клетки имели признаки злокачественной трансформации, и, по мнению авторов, служили источником возникновения новообразований. Таким образом, Houghton J. et al. предложили новую модель возникновения злокачественных новообразований в виде трансформации стволовых/прогениторных клеток костного мозга в условиях хронического воспаления. На основании данной модели легко объяснить такие присущие клеткам опухоли свойства, как способность к самообновлению, от-носительная резистентность к апоптозу, способность к метастазированию и ранней диссеминации. Richard Peek из

Vanderbilt University School of Medicine, один из ведущих специалистов по изучению *Helicobacter*, назвал данную гипотезу интересной и перспективной в контексте разработки методов, направленных на профилактику рака желудка [6].

Тем не менее, некоторые ведущие специалисты в области исследований стволовых клеток выразили сомнения относительно данной модели возникновения злокачественных новообразований. В частности, Ирвинг Вейсман подверг критике данную работу, так как в ней не была исключена возможность слияния клеток костного мозга с эпителиальными клетками слизистой оболочки желудка [6]. Используя разные методики (исследование гистологических срезов на предмет наличия двуядерных эпителиальных клеток с метками; FACS анализ окрашенных пропидием разных типов клеток для сравнительной оценки содержания ДНК; FISH-анализ меченых эпителиальных клеток на предмет наличия слившихся клеток с фенотипом ХХУ, ХХХУ), J. Houghton et al. не обнаружили признаков стабильного слияния клеток. Однако, Ирвинг Вейсман указал, что нет никаких оснований отвергать возможность нестабильного слияния клеток с последующим редукционным делением. Более того, слияние клеток костного мозга с клетками эпителия слизистой оболочки желудка может являться одним из механизмов канцерогенеза, аналогично концепции миелоидных гибридных клеток, развиваемой J. Pawelek [7].

В новой работе, опубликованной в журнале *Stem Cells*, C. Cogle et al. получили данные, что часть клеток в составе некоторых опухолей могут иметь костномозговое происхождение. Однако при этом клетки костного мозга не являются источником новообразования. В исследовании не было обнаружено признаков стабильного или нестабильного слияния клеток опухоли и костного мозга. На первом этапе анализировались биоптаты аденом толстой кишки, обнаруженных у двух женщин с признаками РТПХ (диарея), ранее перенесших трансплантацию гемопоэтических клеток от несовместимых доноров-мужчин. Так как аденомы были обнаружены всего лишь через 2 месяца после трансплантации, предполагалось, что они имеют полностью реципиентское происхождение. К удивлению, от 1 до 4% опухолевых клеток несли маркеры клеток костного мозга. Эти эпителиальные клетки

экспрессировали типичные для клеток аденомы маркеры и имели аналогичную морфологию в виде малой выраженности полярности и ядерной атипии. Интересно, что меченые опухолевые клетки в составе аденомы полностью находились в базальном слое, что может свидетельствовать о недавней миграции их костномозгового предшественника.

На втором этапе авторы использовали APC мутантных мышей (adenomatous polyposis coli gene mutant mice), имеющих высокую склонность к образованию аденом в толстой и тонкой кишке. Костный мозг от доноров-самцов трансплантировался облученным самкам, и, таким образом, трансплантированные клетки были мечены Y-хромосомой. Анализ образцов опухолей, полученных от данных мышей через 3 месяца после трансплантации, показал, что все аденомы в своем составе имели клетки донорского происхождения. Однако их количество составляло не более 10 на каждые 50 тысяч эпителиальных клеток. На третьем этапе исследовались образцы опухолей кожи от четырех женщин и образец рака легких от одной женщины, которые перенесли трансплантацию гемопоэтических клеток от несовместимых доноров-мужчин. Образцы новообразований были получены в сроки 1–4 года посттрансплантационного периода. Кроме того, все пациенты имели признаки РТПХ. 20% клеток опухоли легкого имели донорское происхождение, тогда как в составе опухолей кожи клеток донорского происхождения обнаружено не было.

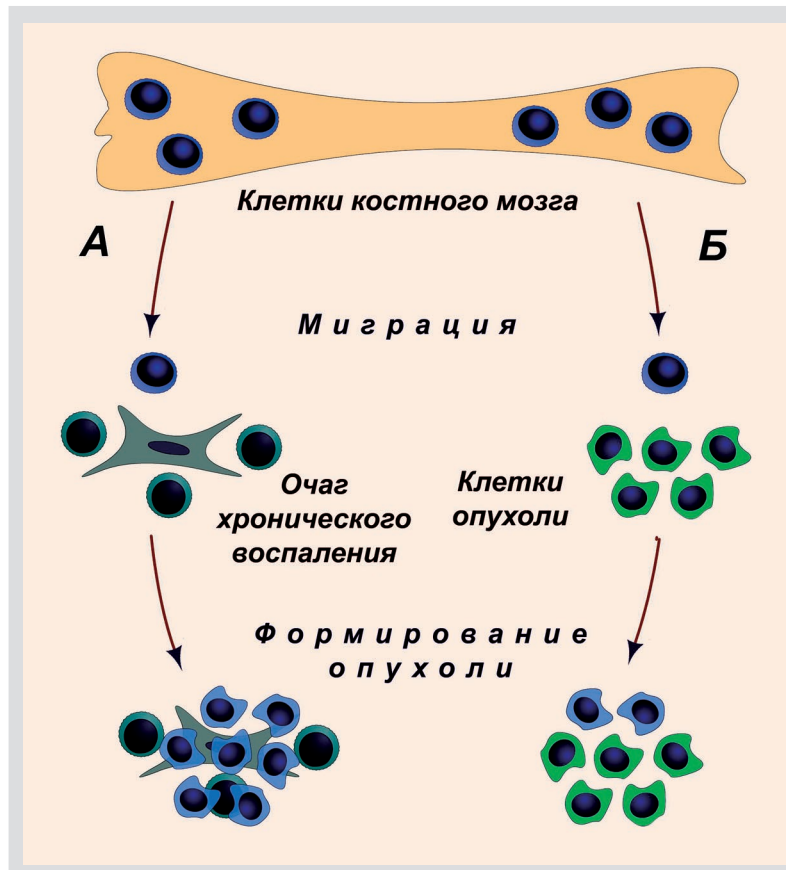
На заключительном этапе использовался метод трансплантации единственной GFP⁺ гемопоэтической клетки. Из 100 самок мышей, получивших трансплантат одной клетки от донора-самца, гемопоэтический химеризм был обнаружен у 3 животных. Костный мозг от этих мышей был трансплантирован вторичным реципиентам. Эти же реципиенты получили внутримышечную инъекцию клеток рака легких от мышей-самок. Через 14 недель после трансплантации опухолевых клеток не менее 1% клеток образовавшихся опухолей составляли клетки костномозгового происхождения. Авторы

заключили, что к местам локализации опухолей мигрируют гемопоэтические стволовые клетки.

Таким образом, в разных моделях авторы показали, что, за исключением опухолей кожи, клетки костного мозга способны мигрировать к местам локализации новообразований, дифференцироваться, приобретая фенотип окружающих тканей и иметь характерные для неопластической трансформации морфологические черты. Необходимо отметить, что во всех моделях в области локализации опухолей имелись очаги воспаления, РТПХ или инфекционное поражение, что являлось необходимым условием для трансформации клеток костного мозга, согласно концепции J. Houghton et al. Интересно, что полученные данные уже были подтверждены в новом исследовании, опубликованном в он-лайн версии журнала Stem Cells [8].

Во всех приведенных случаях исключалась возможность клеточного слияния, используя FISH-анализ клеток опухоли на предмет наличия фенотипа слияния (XXXУ, XXУ). Для исключения возможности «редукционного деления» тетраплоидных клеток использовались данные X. Wang [9], согласно которым среди общего количества слившихся клеток диплоидные клетки составляют не более 30%. Проанализировав 40 Y-позитивных клеток аденомы толстой кишки и 14 Y-позитивных клеток рака легкого, авторы не обнаружили ни одной тетраплоидной клетки. Таким образом, вероятность клеточного слияния с последующим редукционным делением была пренебрежительно мала.

Механизм представленного в данной работе явления остается неясным. Феномены стабильного и нестабильного слияния были исключены. Являются ли клетки костномозгового происхождения в составе опухоли трансформированными? Для ответа на этот вопрос необходимо выделение клеток опухоли костномозгового происхождения с помощью FACS и последующей серийной трансплантацией для исследования туморогенного потенциала.



Роль клеток костного мозга в формировании новообразований эпителиального происхождения: А – концепция, развиваемая J. Houghton et al., предусматривает, что клетки костного мозга мигрируют в очаги хронического воспаления, дифференцируются в клетки эпителия и затем подвергаются злокачественной трансформации; Б – согласно концепции С. Cogle et al. клетки костного мозга мигрируют в места локализации опухолей, где по неизвестным причинам приобретают фенотип опухолевых клеток

ЛИТЕРАТУРА:

1. Dalakas E., Newsome P., Harrison D. and Plevris J. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *The FASEB Journal*. 2005; 19: 1225–31.
2. Krause D., Theise N., Collector M. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; 105: 369–77.
3. Askari A., Unzek S., Popovic Z. et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003; 362: 697–703.
4. Hatch H., Zheng D., Jorgensen M. et al. SDF-1 α /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells*. 2002; 4: 339–51.

5. Houghton J., Stoicov C., Nomura S., et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004; 306: 1568–71.
6. Marx J. Bone Marrow Cells: The Source of Gastric Cancer? *Science*. 2004; 306: 1455–6.
7. Pawelek J. Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer. *Lancet Oncol*. 2005; 6: 988–993.
8. Avital I., Moreira A., Klimstra D. et al. Donor Derived Human Bone Marrow Cells Contribute to Solid Organ Cancers Developing After Bone Marrow Transplantation. *Stem Cells*. First published online August 9, 2007.
9. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003; 422: 897–901.

Подготовил В.С. Сергеев

По материалам: Cogle C., Theise N., Fu D. et al. Bone Marrow Contributes to Epithelial Cancers in Mice and Humans as Developmental Mimicry. *Stem Cells* 2007; 25: 1881–7

Использование митотической зиготы для репрограммирования ядра соматической клетки и клонирования

До сих пор клонирование животных и получение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) основано на технологии переноса ядра соматической клетки ядер в мейотические овоциты. Попытки перенести ядро соматической клетки в оплодотворенный овоцит (зиготу в интерфазе) чаще всего оканчивались неудачей. В связи с этим с целью получения «собственных» линий ЧЭСК традиционно для процесса переноса ядра принято использовать неоплодотворенные человеческие овоциты. Исследовательская группа под руководством Кевина Еггана из Harvard Stem Cell Institute сообщает о том, что мышинные зиготы (остановленные в митозе) способны поддерживать репрограммирование соматической клетки и могут использоваться как для получения линий ЭСК, так и для клонированных животных. Таким образом, человеческие зиготы, и, возможно, бластомеры, помимо овоцитов, могут стать реальными кандидатами для использования в технологии создания индивидуальных линий ЧЭСК.

В первых успешных экспериментах по переносу ядра на грызунах, исследователи провели обмен пронуклеусами между двумя оплодотворенными зиготами [1]. Полученные эмбрионы развились в полноценных взрослых животных. Однако при проведении похожих экспериментов с использованием ядер на стадиях дробления такого результата не получили, поэтому предположили, что клонирование млекопитающих невозможно, т.к. репрограммирование позднего ядра заблокировано. Однако вскоре было обнаружено, что цитоплазма неоплодотворенного овоцита способна вносить изменения в программу перенесенного ядра, и тогда были реализованы проекты по клонированию овцы, кролика, свиньи и мыши [2–4].

Не так давно было показано, что потенциал развития зародыша после переноса ядра в неоплодотворенный овоцит существенно выше такового по сравнению с переносом в оплодотворенный или искусственно активированный овоцит. То есть, потенции яйцеклетки, необходимые для успешного развития особи после переноса ядра, теряются (изменяются) после ее оплодотворения. Таким образом, и для процедуры переноса ядра с целью получения индивидуальных линий ЧЭСК необходимы неоплодотворенные овоциты.

Группа Кевина Еггана предположила, что факторы, необходимые как для репрограммирования или/и эмбрионального развития, присутствующие в цитоплазме неоплодотворенных мейотических овоцитов, становятся изолированными (уединенными) в пронуклеусах зигот. Такая компарментализация может объяснить невозможность энуклеированной интерфазной зиготы поддерживать развитие после переноса ядра, так как удаление пронуклеусов во время энуклеации может элиминировать одновременно и эти факторы, тем самым предотвращая дальнейшее развитие. Удаление конденсированных хромосом во второй метафазе мейоза из овоцита, напротив, не влияет на эти процессы. Если эта модель верна, то разрушение ядерного конверта (ядерной оболочки) при вступлении в первый эмбриональный митоз, может привести к высвобождению критических факторов в цитоплазму, что позволит удалять хромосомы без удаления тех самых необходимых сигналов к развитию.

Для того, что бы определить? может ли цитоплазма митотической зиготы поддерживать репрограммирование ядра, исследователи обратимо затормозили зиготы в митозе, удалили хромосомы и заменили их хромосомами либо эмбриональной, либо соматической донорской клетки. Ученым удалось обнаружить, что такие генетически реконструированные зиготы могут использоваться для получения клонированных животных и линий ЭСК.

Мышинные зиготы синхронизировали на стадии двух отдельных пронуклеусов путем разборки микротрубочек в митозе. Другие зиготы были синхронизированы таким же способом, но в интерфазе. Затем оба пронуклеуса в интерфазных зиготах были удалены, а вместо них трансплантированы пронуклеусы другой группы зигот. В таком случае происходило полное развитие. При пересадке ядер от 2-х дневного эмбриона происходило формирование бластоцисты, однако с гораздо более низкой эффективностью (70%).

Важнейшим результатом работы также является получение клонированных животных. Для их получения вместо вынесенных хромосом были использованы хромосомы культивируемых линий ЭСК, для того, чтобы различить хромосомы из ЭСК (донора) и хромосомы зиготы (реципиента) хромосомы донора несли флуоресцентную метку, связанную с