

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bissell M., Radisky D. Putting tumors in context. *Nature Rev. Cancer* 2001; 1: 46–54.
2. Hall B., Andreeff M., Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2007; 180: 263–83.

3. Young H. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat. Rec.* 2001; 263: 350–60.
4. Fox J., Chamberlain G., Ashton B., Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br. J. Haematol.* 2007; 137: 491–502.
5. Pittenger M. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143–7.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Karnoub A., Dash A., Vo A. et al.

Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. Nature 2007; 449: 557–65

Хемокины, экспрессируемые мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, в терапии острой печёночной недостаточности

Острая печёночная недостаточность – заболевание, характеризующееся быстро развивающимися нарушениями синтетических функций печени, часто сочетающееся с системной воспалительной реакцией. Его терапия связана с множеством проблем, так как болезнь быстро приводит к развитию у пациентов энцефалопатии, сепсиса, почечной недостаточности, кровотечений в желудочно–кишечном тракте, общих метаболических нарушений. Клинические испытания, в которых тестировалась эффективность применения биосинтетической печени перед трансплантацией печени в случае быстро развивающейся острой печёночной недостаточности, показали, что, несмотря на многообещающие результаты этого метода, его использование не всегда возможно. В основном это связано с отсутствием постоянного источника функционально стабильных гепатоцитов [1], а также с воспалительной реакцией, развивающейся в тканях печени.

Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК) играют ключевую роль в поддержании гемопозеза [2], а также обладают иммуномодулирующими функциями [3]. Исследователи из группы В. Parekkadan предположили, что паракринные функции ММСК могут оказать существенный терапевтический эффект при острой печёночной недостаточности в случае, когда потеря большой массы клеток паренхимы сочетается с системной воспалительной реакцией. В опытах на животных было продемонстрировано, что внутривенное введение лизатов ксеногенных ММСК увеличивает выживаемость мышей с острой печёночной недостаточностью.

Гистологические исследования печени таких животных показали, что после терапии снижается степень инфильтрации печёночной паренхимы лейкоцитами, а также восстанавливается структура желчевыводящих протоков. В дополнение к этому авторы выяснили, что экстракт ММСК приводит к миграции лейкоцитов из повреждённого органа в кровеносное русло, а также провели анализ секретируемых ММСК молекул.

В эксперименте использовались крысы линии Sprague–Dawley, которым был инъецирован гепатотоксин D–галатозамин (Gal–N) [4]. Это приводило к обширному некрозу ткани и последующей лейкоцитарной инфильтрации печени, в результате чего в зоне повреждения значительно возрастала концентрация провоспалительных факторов.

В течение 72 часов после инфузии в периферическую вену 2×10^6 ксеногенных ММСК не было отмечено значительных улучшений в состоянии животных. Авторы связывают это с иммунным отторжением ксеногенных клеток. Также отсутствие эффекта может быть связано с тем, что ММСК не достигали тканей органа–мишени. В то же время внутривенное введение лизатов тех же клеток приводило к значительному (до 50%) повышению выживаемости животных. В качестве контроля использовались физиологический раствор и лизаты фибробластов.

Авторы предположили, что введение лизатов ММСК приводит к тому, что лейкоциты мигрируют из зоны инфильтрации обратно в кровоток. Чтобы проверить эту гипотезу, исследователи ввели радиоактивно меченные лейкоциты крысам, получившим инъекции Gal–N, а затем провели терапию лизатами ММСК. После введения лизатов интенсивность радиоактивной метки в печени постепенно снижалась. Авторы считают, что основная роль в этом процессе принадлежит многочисленным хемокинам, экспрессируемым ММСК. Было продемонстрировано, что терапевтическим эффектом обладает фракция лизата, связывающая гепарин–сульфат, который является лигандом большинства хемокинов. Эта фракция составляла до 30% объёма лизата.

Анализ протеома ММСК показал, что они экспрессируют большое число молекул, ответственных за иммуносупрессию и за регенерацию печени, однако авторы не указывают, каких именно. Исследователи планируют продолжить данную работу и определить, какие из хемокинов играют ключевую роль в восстановлении печени при острой печёночной недостаточности. Также следует отметить тот факт, что к гепарин–сульфат–связывающей фракции могут относиться не только различные хемокины, но и такие факторы, как HGF (фактор роста гепатоцитов). Исследователи считают, что использование метаболических функций ММСК может послужить началом нового этапа в иммунотерапии заболеваний печени. Однако в представленной работе недостаточно данных для такого вывода – например, не указан спектр экспрессируемых ММСК белков, не проведено сравнение полученных данных с данными других авторов. Возможность использования этого подхода в лечении рассмотренной и других типов патологий, включающих воспалительный и аутоиммунный компонент, остаётся вопросом для дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Strain A.J., Neuberger J.M. A bioartificial liver—state of the art. *Science* 2002; 295: 1005–9.

2. Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S. et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 2006; 20: 161–71.
3. Aggarwal S., Pittenger M. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815–22.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Parekkadan B., Daan van Poll, Suganuma K. et al. *Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. PloS ONE* 2007; 2(9): e941

КЛОНИРОВАНИЕ

Успешный опыт клонирования приматов

Идея клонирования воплощена в методе переноса ядра (nuclear transfer, NT) клетки-донора в энуклеированную неоплодотворенную яйцеклетку, находящуюся в метафазе второго деления мейоза [1]. Ранее источником ядра для подобных исследований служили эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), получаемые из доимплантационной бластоцисты [2], затем предпочтения стали отдавать более доступным клеткам взрослого организма [1, 3]. Цели научных разработок в данной области заключаются как непосредственно в получении клонов животных для лабораторных исследований, так и в выделении генетически идентичных клеткам реципиента линий ЭСК, которые могут использоваться в области клеточных биотехнологий без реакции отторжения и необходимого применения иммунодепрессантов [4].

В настоящее время с помощью метода переноса ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) достигнуты успехи в клонировании мышей [5], овец [3], коров [6], свиней [7]. Однако для медицины большее значение имела бы отработанная технология получения клонов приматов и их эмбрионального материала, которые могут быть использованы для исследований ряда заболеваний человека, разработки вакцин, получения биологически активных веществ, что, зачастую, неосуществимо у других животных [8]. Однако клонировать приматов не удавалось из-за процессов преждевременной активации цитоплазмы овоцитов и нарушения ядерного репрограммирования [4].

После введения донорского ядра и активации цитоплазмы яйцеклетки происходит ядерное ремоделирование, обусловленное деятельностью активирующего мейоз фактора (maturation promoting factor, MPF) и способствующее процессам репрограммирования. Активность MPF после проведения SCNT зависит от вида животных-доноров, клеточного материала и от примененных протоколов метода [9]. До недавнего времени в опытах по клонированию приматов эффективность формирования бластоцист была очень низкой, наблюдалась преждевременная конденсация хромосом и распад ядерной мембраны [4], что связано с пониженной активностью MPF.

14 ноября 2007 года в он-лайн версии журнала *Nature* были опубликованы результаты исследования J.A. Byrne и S.M. Mitalipov с соавт., которые получили бластоцисты макаки-резуса и исследовали выделенные из них клони-

рованные эмбриональные клетки (cloned rhesus embryonic stem, CRES) на предмет соответствия нормальным ЭСК животных.

В работе использовалась культура фибробластов кожи, полученная от девятилетней особи мужского пола, и овоциты (n = 304) приматов (n = 14). Ядра фибробластов электрофузией вводили в цитоплазму энуклеированных овоцитов, находящихся в метафазе II. Активация цитоплазмы производилась по специальным протоколам, включающим ряд краткосрочных последовательных инкубаций в различных условиях, что выгодно отличает схему от применявшихся ранее другими исследователями в работах по клонированию. Этот протокол позволил предотвратить преждевременную цитоплазматическую активацию и стимулировать деятельность MPF.

В эксперименте удалось получить только две «зиготы», образованные из овоцитов разных особей и ядер фибробластов взрослого макаки-самца. Таким образом, эффективность получения эмбрионов составила 0,7%. Культивирование производили до стадии бластоцист, из внутренней клеточной массы которых выделяли CRES. В дальнейшем сравнивали свойства двух линий клонированных клеток, полученных от овоцитов двух особей соответственно, между собой, с контрольной группой и культурой фибробластов кожи. Группу контроля составляли две линии ЭСК, полученных из оплодотворенных эмбрионов (донорами овоцитов служили те же особи, а донором спермы — второй самец).

Методами генетического анализа была показана идентичность ядерной ДНК обеих линий CRES и фибробластов кожи, а также лейкоцитов крови, полученных от того же животного-донора. Нормальный кариотип 42 XY был сохранен, однако у части клеток первой линии CRES выявлена изохромосома Y, состоящая из двух копий длинного плеча, а также у 12% CRES-1 наблюдалась потеря Y-хромосомы. Было доказано соответствие нуклеотидных последовательностей митохондриальных ДНК CRES и овоцитов женских особей-доноров. Эти данные в совокупности являются достоверным признаком клонированных клеток [4].

Обе линии демонстрировали типичную морфологию ЭСК, сохраняли недифференцированное состояние после 20 пассажей и экспрессировали ключевые факторы «стволовости», включая OCT4, SSEA-4, TRA1-60 и TRA1-81, что отражает