



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

успешное репрограммирование. Двенадцать основных транскрипционных факторов, характерных для ЭСК макак-резусов, были описаны в более ранней работе J.A. Byrne с соавт. (2006). Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в молекуле ДНК клонированных клеток и группы контроля были определены гены NANOG, SOX2, LEFTY, TDGF, TERT, высокий уровень экспрессии которых также служит критерием плюрипотентности и «стволовости» [10].

Транскрипционный анализ клеточных культур показал, что экспрессия 90% специфических соматических генов в обеих линиях CRES и контроля была существенно ниже по сравнению с таковой в фибробластах кожи, а активность 85% генов, характерных для ЭСК, напротив, значительно выше.

Для оценки плюрипотентности клонированные клетки культивировали в условиях, необходимых для нейральной дифференцировки. В результате они приобретали удлинённую форму, экспрессировали соответствующие иммуногистохимические маркеры – ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2), β -III-тубулин, тирозингидроксилаза. Кроме того, после инъекции в организм иммунодефицитных мышей обе линии CRES формировали тератомы, цитологический

состав которых был характерен для тканей, развивающихся из всех трёх зародышевых листков.

Ранее уже проводились эксперименты с клонированием приматов [8, 11]. В частности, S.M. Mitalipov с соавт. ещё в 2002 году опубликовал материалы исследования, в котором получил бластоцисты макак-резусов методом переноса в ооциты ядер фетальных фибробластов и ЭСК, полученных из оплодотворённых эмбрионов. Однако выделение клеток-доноров в этом случае предполагает значительно больше затрат ресурсов и времени, нежели в случае использования культуры фибробластов кожи взрослого животного. Более того, не представляется возможным использовать подобную методику в практике получения генетически идентичного клеткам реципиента пула ЭСК.

Таким образом, исследование J.A. Byrne и S.M. Mitalipov с соавт. открывает значительные перспективы в получении генетически идентичных клеткам реципиента ЭСК, как минимум, и, как максимум, в клонировании человека. Тем не менее, во всех описанных работах мониторинг эмбрионов производился лишь до стадии бластоцисты, а не на протяжении всего эмбриогенеза и части постнатального развития, что оставляет возможные проблемы биолого-социального плана не раскрытыми.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wilmut I., Schnieke A., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385 (6619): 810–3.
2. Willadsen S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63–5.
3. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64–6.
4. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450: 497–502.
5. Wakayama T., Perry A., Zuccotti M. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–74.
6. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256–8.

7. Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D. et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407: 86–90.

8. Mitalipov S.M., Yeoman R.R., Nusser K.D. et al. Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1367–73.

9. Mitalipov S. M., Zhou Q., Byrne J.A. et al. Reprogramming following somatic cell nuclear transfer in primates is dependent upon nuclear remodeling. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 2232–42.

10. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.

11. Meng L., Ely J., Stouffer R. et al. Rhesus Monkeys Produced by Nuclear Transfer. *Biology of reproduction* 1997; 57: 454–9.

12. Byrne J.A., Mitalipov S.M., Clepper L. et al. Transcriptional profiling of rhesus monkey embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 2006; 75: 908–15.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Byrne J., Pedersen D., Clepper L. et al.

Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. Nature 2007; 450: 497–502