

микроглиальных элементов. Более того, ММСК экспрессируют молекулу SDF-1, которая служит фактором хемотаксиса для клеток миелоидного ряда. Возможно, именно экспрессия этих факторов *in situ* приводит к пост-операционному воспалению и разрушению трансплантатов.

Хотя гистологические и иммуногистохимические данные (клетки выявлялись антителами к GFP) свидетельствовали о полном отторжении трансплантата, в нервной ткани были обнаружены BrdU и BBZ (другие 2 метки ММСК), что позволяло предположить выживание части ММСК и их созревание. Оказалось, что при трансплантации ММСК в сформированный мозг происходит перенос их маркеров в клетки хозяина. В качестве контроля были использованы нежизнеспособные ММСК, прошедшие несколько циклов быстрой заморозки-разморозки, либо подвергнутые микроволновому облучению, а затем трансплантированные в гиппокамп и стриатум интактных крыс. И, действительно, в течение 12 недель после трансплантации меченные BrdU и BBZ клетки широко распространились по обоим регионам трансплантации. Их фенотипические характеристики полностью соответствовали характеристикам клеток, обнаруженных после трансплантации жизнеспособных ММСК – это были нейроны реципиента. Таким образом, происходил перенос маркеров из трансплантированных ММСК в клетки-предшественники нейронов хозяина, которые в дальнейшем дифференцировались. И хотя стриатум, в отличие от гиппокампа, не явля-

ется нейрогенной областью, в последнее время появились данные об отдельных прогениторных клетках, присутствующих в нём. Возможно, именно с этим связана схожесть картин в обоих районах трансплантации.

Таким образом, это исследование противоречит как данным о пластичности ММСК при их инфузиях в интактный либо повреждённый мозг, а также данным об их иммунопривилегированности. Возможно, в ранних экспериментах исследователи ошибочно определяли выживание и пластичность ММСК, основываясь на обнаружении в тканях реципиента маркеров BrdU и BBZ. На самом деле, при трансплантации аллогенные ММСК отторгаются посредством воспалительной реакции, в которой участвуют клетки микроглии реципиента, а маркеры остаются в тканях в результате переноса. Явление переноса маркеров отрицает феномен трансдифференцировки ММСК *in vivo* в условиях подходящего микроокружения. Результаты этого исследования ставят под сомнение перспективу использования аллогенных ММСК в качестве источника нейронов при трансплантациях нервной ткани, а также авторы статьи призывают к осторожности при дальнейшем использовании BrdU и BBZ в качестве маркеров трансплантированных мезенхимных стволовых клеток. Вместе с тем, использование этих маркеров может быть причиной артефактов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* 2005; 57(6): 874–82.
2. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000; 61(4): 364–70.
3. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp. Neurol.* 2000; 164(2): 247–56.
4. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мультипотентных

мезенхимных стромальных клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2005; 2: 39–42.

5. Munoz-Elias G., Marcus A.J., Coyne T.M. et al. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J. Neurosci.* 2004; 24(19): 4585–95.
6. Doetsch F., Caille J., Lim D.A. et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97(6): 703–16.
7. Gage F.H., Kempermann G., Palmer T.D. et al. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 1998; 36(2): 249–66.

Подготовила А.С. Григорян
По материалам *Stem Cells* Published online July 27, 2006

Первое потомство, полученное с использованием «искусственных» сперматозоидов, выделенных из эмбриональных стволовых клеток

Эксперименты по выделению и характеристике половых клеток из эмбриональных стволовых (ЭСК) позволят исследовать биологические процессы в гамететах и гамето-генез, а также стать одним из способов лечения бесплодия в будущем [1]. До недавнего времени было показано формирование из ЭСК овоцитов [2] и сперматозоидов [3, 4]. Однако ни одна группа до сих пор не показала функциональность выделенных гамет, то есть их способность давать нормальное потомство. Полученные путем оплодотворения «искусственными» гаметами blastocисты не имплантировали животным.

Недавно группа Karim Nayernia из Georg-August University (Göttingen, Germany) впервые показала способность сперматозоидов, выделенных из ЭСК мыши, к оплодотворению и развитию взрослых животных из полученных зародышей. Работа опубликована в журнале *Developmental Cell*.

Для определения функциональной активности полученных клеток ученые использовали две генетические конструкции с промоторами генов, характерных для премейотических гаплоидных мужских половых клеток. Под их контролем запускалась экспрессия флуоресцентных белков – зеленого и красного соответственно. Благодаря таким генетическим меткам, исследователи могли выделить сперматогонимальные клетки в культуре ЭСК. Эти гены вносили в ЭСК в культуру и культивировали до 2 месяцев. В процессе культивирования использовался коктейль растворимых факторов, которые способствовали выживанию и самообновлению мышинных половых клеток. После культивирования в такой среде до 60% клеток, экспрессирующих трансген (а значит, коммитированных по пути развития мужских половых клеток), сортировались и переносились в базовую среду без факторов дифференцировки. Через два месяца клетки подвергали

повторной сортировке на основе экспрессии обоих трансгенов. Таким путем исследователям удалось вывести 2 сперматогонийных линии – SSC7 и SSC12.

Клетки были способны формировать эмбрионидные тельца и экспрессировали белки, характерные для сперматогониев. Для определения функциональной активности полученных клеточных линий их пересаживали в семенник мышам (второй служил в качестве контрольного), которым предварительно была проведена абляция половых клеток. У 2 из 10 проанализированных животных в просвете семенного канальца, а также в его стенке, были обнаружены картины нормального сперматогенеза. Однако подвижность полученных клеток была значительно снижена по сравнению с положительным контролем. Происхождение постмейотических клеток в просвете канальца подтверждалось активной флуоресценцией трансгенных белков. У пяти мышей было зафиксировано образование тератом после трансплантации.

Внутрицитоплазматическая инъекция клеток полученных линий в неоплодотворенный овоцит мышей дикого типа приводила к последующему выбросу полярного тельца и формированию пронуклеусов. Двухклеточные эмбрионы, полученные таким образом, имплантировали в яйцевод псевдо-беременной самки. Из 65 перенесенных эмбрионов родилось 12 мышат. По сравнению с мышатами дикого

типа, мышата, полученные искусственным путем, были либо меньше, либо больше по размеру и погибали в течение 5 месяцев. Клетки, несущие трансген, были обнаружены в семенниках некоторых из потомков.

Несмотря на низкую эффективность переноса, рождение слабых и дефектных детенышей, образование тератом после трансплантации клеток, авторы впервые продемонстрировали возможность рождения потомства, полученного после оплодотворения *in vitro* «искусственно» полученными гаметтами из ЭСК. Таким образом исследователи доказали, что мужские гаметы, полученные из ЭСК, полностью функциональны. При усовершенствовании методики получения половых клеток из ЭСК и увеличении эффективности оплодотворения и рождения здоровых детенышей, откроются новые перспективы использования данной технологии в биологии и медицине. Прежде всего, разработанная система может служить прекрасной моделью изучения дифференцировки гамет. Возможность выделения гамет из ЭСК может решить проблему некоторых форм бесплодия. Кроме того, выделение функциональных мужских и женских гамет из одной линии ЭСК позволит полностью автономно поддерживать и обновлять эту линию через создание новых blastocyst. Тем не менее, развитие таких технологий одновременно порождает и ряд этических вопросов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Лопатина Т.В. Искусственный гаметогенез: дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в гаметы. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 2: 32–4.
2. Hubner K., Fuhrmann G., Christenson L.K. et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science 2003; 300(5623): 1251–6.

3. Toyooka Y., Tsunekawa N., Akasu R., Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100(20): 11457–62.

4. Lacham-Kaplan O., Chy H., Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem (ES) cells into ovarian structures containing oocytes. Stem Cells 2006; 24(2): 266–73.

Подготовила В.С. Мелихова
По материалам Dev. Cell 2006; 11(1): 125–32

Nanog – фактор репрограммирования ядра взрослой соматической клетки

Изучение и развитие технологии переноса ядра взрослой соматической клетки млекопитающих в энуклеированный овоцит позволило заключить, что генетические и эпигенетические изменения, приобретаемые клеткой в процессе дифференцировки, могут быть полностью «репрограммированы». При этом происходит активация «эмбриональных» генов и ингибирование генов, отвечающих за дифференцировку. Оказалось, что репрограммирование взрослого ядра может быть также достигнуто и слиянием с эмбриональной стволовой клеткой (ЭСК) [2, 3]. Таким образом, взрослая соматическая клетка может вернуться в эмбриональное плюрипотентное состояние и дать начало новому эмбриону.

Остаётся загадкой, какие именно факторы, содержащиеся в овоците и в ЭСК, могут обуславливать феномен генетического и эпигенетического репрограммирования «взрослого» ядра? Группа Austin Smith показала, что одним из таких факторов является ген Nanog. Результаты работы опубликованы в недавнем номере журнала Nature.

Ген Nanog был изолирован и описан Ian Chambers из Эдинбургского университета [4]. Он получил такое название по имени страны вечной юности Тир Нан Ог из кельтской мифологии. При взаимодействии с двумя другими важнейшими факторами – Oct3/4, и SOX-2, Nanog поддерживает «стволовость» через активацию генов, участвующих в про-

цессе деления ЭСК, и инактивацию генов, запускающих процессы развития и дифференцировки [5].

Для проверки гипотезы значения Nanog для репрограммирования ядра и приобретения клеткой свойств плюрипотентности исследователи создавали гибриды нейтральных стволовых клеток (НСК) с ЭСК, сверхэкспрессирующей ген Nanog (ЭСК-N), сливая их *in vitro*. Причём избыточная экспрессия трансгена с Nanog в ЭСК не влияла на частоту слияния. Такой вариант слияния приводил к формированию гибридных колоний, имеющих характеристики ЭСК. Оказалось, что частота формирования колоний была в 200 раз выше, чем в обычных НСК-ЭСК – гибридах и сравнима с таковой при слиянии ЭСК-ЭСК. Клетки таких колоний теряли экспрессию генов НСК и не росли в «нейрональной» селективной среде. Колонии демонстрировали признаки репрограммирования НСК-ядра и плюрипотентности – экспрессию типичных для ЭСК генов, потерю ядерного маркера НСК, спонтанную дифференцировку эмбрионидных телец в сокращающиеся миоциты и т.д. Слияние НСК (НСК-N), избыточно продуцирующих Nanog, с обычными ЭСК приводило к возникновению эмбриональных колоний в 8 раз чаще, чем в контрольных слияниях НСК-ЭСК.

Гиперэкспрессия Nanog в трансгенных ЭСК приводила также к значительному увеличению выхода колоний при их слиянии с эмбриональными фибробластами и тимоцитами. Таким