



НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Успешное получение бластоцист человека методом SCNT

Вопрос клонирования животных и человека, несмотря на морально-этические противоречия, находит все больше заинтересованных исследователей. Как правило, официальная цель подобных исследований озвучивается как получение пациент-специфичных линий стволовых клеток, а идея создания истинного клона человека не афишируется. В настоящее время получены клоны целого ряда млекопитающих [1–3], однако исследования в области клонирования человека пока еще малочисленны. Это связано не только с этическими ограничениями, но и с проблемами в оформлении соответствующей документации и разрешений на работу с яйцеклетками человека.

Уже были предприняты первые шаги по созданию эмбрионов человека «альтернативным путем». В частности, воспроизведены ранние стадии эмбриогенеза (до бластоцисты) с использованием в качестве клеток-доноров т. н. «кариопласта», линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека [4], фетальных фибробластов [5]. Однако успешность результатов не была подтверждена методами генного анализа.

Основным методологическим направлением, применяющимся для реализации идеи клонирования, является перенос ядра (nuclear transfer, NT), суть которого состоит в объединении ядра донорской клетки (кариопласта) с цитоплазмой овоцита II деления мейоза (цитопластом). В соответствии с этим протокол NT включает ряд обязательных этапов: знуклеирование овоцита, подготовку донорского ядра, перенос его в цитопласт, а также активацию, инициирующую эмбриональное развитие [6]. Каждый шаг последовательности может быть выполнен с помощью различных методик. Например, введение генетического материала клетки-донора ядра в цитоплазму овоцита II порядка потенциально осуществимо как клеточным слиянием, так и микроинъекцией ядра [7].

В январе 2008 года в он-лайн версии журнала Stem Cells опубликованы материалы исследования A.J. French с соавт. о клонировании человека. В этой работе в качестве источника ядра использовали соматические клетки взрослого человека – фибробласты кожи. Иными словами, эксперимент выполнен посредством метода переноса ядра соматической клетки (somatic cell nuclear transfer, SCNT), который ранее был успешно проведен в работе по клонированию приматов [3].

В исследовании использовались 29 зрелых овоцитов II деления мейоза, знуклеация которых производилась двумя разными способами: экструзией и аспирацией. Первый способ заключается в том, что заостренной стеклянной микропипеткой осуществлялось «выдавливание» ядра через цитоплазматическую мембрану и прозрачную оболочку. Вторым способом предполагал экстрагирование тем же инструментом ядродержащей области цитоплазмы (в 12 случаях –

с первым полярным тельцем). Преимуществ одного метода перед другим выявлено не было.

Отбор фибробластов 3–5-го пассажа производился посредством проточной цитометрии, а также по морфологическому критерию, основанному на данных A.C. Voquest (1999), в соответствии с которыми 95% клеток диаметром 10–15 мкм находятся в оптимальной для использования стадии клеточного цикла – в G₁ (или G₀) периоде [9]. Нужно отметить, что экспериментальное обоснование зависимости диаметра и фазы клеточного цикла, которое учитывали авторы работы, было показано для фетальных фибробластов. Нормальный диплоидный набор хромосом фибробластов подтверждался цитогенетическим анализом. Интеграция системы «кариопласт–цитопласт» производилась посредством клеточного слияния.

Полученные путем SCNT клетки через 2–3 часа после слияния, а также овоциты II деления мейоза были подвергнуты партеногенетической активации. В первые 24 часа у 7 зигот, полученных посредством SCNT, наблюдались дегенерация и лизис, однако у 66% клеток через 6–7 часов после химической активации выявлялись процессы ремоделирования ДНК. На третий день из группы SCNT-овоцитов было получено 10 морул, состоящих из 5 и более клеток, а на пятый–шестой день определялось 5 бластоцист, количество бластомеров которых находилось в пределах 41–72. Столько же бластоцист исследователи получили партеногенетической активацией овоцитов II деления мейоза, но в их составе насчитывалось порядка 35–54 клеток.

Исходный клеточный материал и бластоцисты были подвергнуты генной дактилоскопии (анализ митохондриальной и ядерной ДНК) с целью установления соответствия последовательностей ДНК бластоцист и донорских клеток, а также выявления возможного «загрязнения» в процессе осуществления технических мероприятий. В двух случаях в каждой группе не удалось показать достоверных данных, касающихся происхождения бластоцист. В остальном, генотип зародышей, полученных посредством SCNT, соответствовал генотипу донорских фибробластов и не включал фрагменты генетического материала овоцитов. Характерно, что вследствие клеточного слияния, наряду с внесением в цитопласт ядра от фибробласта, происходит передача и митохондриальной ДНК соматической клетки. В дальнейшем, по всей видимости, митохондрии, принадлежавшие овоциту замещаются новыми, а митохондриальная ДНК цитопласта подвергается вырождению.

Таким образом, A.J. French с соавт. впервые воспроизвели начальные этапы клонирования человека с использованием метода SCNT. Показав идентичность генома полученных бластоцист и донорских клеток, исследователи не осуществляли детальный хромосомный анализ, нацеленный

на выявление возможных хромосомных aberrаций, не выявляли уровни экспрессии критических эмбриональных генов,

таких как Oct 4, Cdx2 и др., то есть не доказали, что клетки были полностью репрограммированы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64–6.
2. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256–58.
3. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450 (7169): 497–502.
4. Stojkovic M., Stojkovic P., Leary C. et al. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2005; 11: 226–31.
5. Lu C., Lin G., Xie C. et al. Reconstruction of human embryos derived from

somatic cells. *Chinese Science Bulletin* 2003; 48: 1840–3.

6. Campbell K.H. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1999; 1: 3–15.

7. Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–74.

8. French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer (SCNT) with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485–93.

9. Boquest A.C., Day B.N., Prather R.S. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 1013–19.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts Development of Human cloned Blastocysts Following Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) with Adult Fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485–93

Получение мультипотентных клеток из GPR125⁺ сперматогенных стволовых клеток

Сперматогенез является тонко регулируемым и сложным процессом, в который вовлечено несколько типов клеток. К ним относятся клетки, способные дифференцироваться в гаметы; гормон-секретирующие клетки Лейдига и клетки Сертоли, обеспечивающие регуляцию и дифференцировку клеток полового ряда. Первичные половые клетки, или гоноциты, имеют внегонадное происхождение. Они обособляются на задней стенке первичной кишки от прочих клеток формирующегося эмбриона и мигрируют в область зачатка половых желез на вентральной стороне мезонефроса. У эмбрионов мужского пола мигрирующие в гонады гоноциты делятся несколько раз. Тем самым они преобразуются в просперматогонии и создают некоторое число (определенный, но не окончательный пул) стволовых сперматогенных клеток. Затем сперматогенез приостанавливается на этом этапе и возобновляется уже при наступлении полового созревания, когда происходит дифференцировка стволовых клеток в сперматогонии типа А (темная цитоплазма). Они медленно делятся с образованием светлых быстроделющихся прогениторных клеток, дающих начало сперматогониям типа В. Последние, в свою очередь, вступают на путь дифференцировки в сперматоциты, а далее в сперматиды и сперматозоиды.

Культивирование сперматогенных стволовых/прогениторных клеток (СпСПК) до последнего времени являлось трудновыполнимой задачей, так как выделенные из протоков извитых семенных канальцев клетки даже на фидерном слое инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов быстро теряют пролиферативную активность [1]. Тем не менее, используя специфический коктейль факторов роста, в состав которого входили glial cell line-derived neurotrophic factor, EGF, bFGF и LIF, T. Shinohara с соавт. (2003) удалось культивировать СпСПК мыши в течение длительного времени [2]. После пятимесячного культивирования трансплантация полученных клеток (germinal stem cells, GS-клетки) бесплодным мышам приводила к восстановлению сперматогенеза. Формирования тератом или каких-либо соматических тканей обнаружено не было, что свидетельствовало

о том, что GS-клетки надежно коммитированы в сперматогенном направлении.

Однако в более позднем исследовании T. Shinohara с соавт. (2004) обнаружили, что после 4–7 недель культивирования GS-клеток, наряду с типичными колониями, выявляются колонии клеток, по своей морфологии сходные с ЭСК [3]. Более того, клетки ЭСК-подобных колоний удалось выделить и размножить при культивировании в среде, содержащей 15% сыворотки плодов коров и LIF, что является стандартным условием культивирования ЭСК. ЭСК-подобные клетки дифференцировались в разные типы соматических клеток при индукции *in vitro* и формировали тератомы при трансплантации иммунодефицитным мышам. Введение ЭСК-подобных клеток в полость бластоцист приводило к образованию химерных эмбрионов. Наличие в семенниках неонатальных мышей клеток с мультипотентной природой позже было подтверждено немецкой исследовательской группой K. Guan и др. (2006). Полученные при культивировании СпСПК мыши мультипотентные клетки получили обозначение maGSCs (multipotent adult germline stem cells) [4]. Тем не менее, фенотипический профиль специфической субпопуляции сперматогенных клеток, которые могут при культивировании конвертироваться в ЭСК-подобные клетки, остается плохо изученным.

Ранее было показано, что поверхностный белок GPR125, экспрессирующийся в семенниках неонатальных мышей, является потенциальным маркером СпСПК [5]. Группа исследователей под руководством S. Rafii из Медицинского института Говарда Хьюза предположила, что GPR125⁺ является маркером субпопуляции сперматогенных клеток, конвертирующихся в ЭСК-подобные клетки при длительном культивировании.

На первом этапе исследования, для визуализации экспрессии GPR125 генноинженерными методами были получены мыши, несущие ген LacZ, под контролем GPR125-промотора. Окрасивание срезов семенников на наличие галактозидазы показало, что экспрессия маркера обнаруживалась лишь в извитых семенных канальцах и ограничивалась