Технология создания онковакцин на основе активированных ДК антигенами злокачественных стволовых клеток имеет огромные перспективы и, безусловно, будет развиваться. У человека уже описано несколько видов ЗСК, ведётся поиск их уникальных маркёров, которые могут служить мишенью клеточной, химио– и иммунотерапии. Безусловно, перед началом клинических испытаний методика, предложенная итальянскими исследователями, должна быть проверена на других моделях. Тем не менее, именно такой подход найдёт быстрое клиническое воплощение.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Banchereau J., Palucka A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat. Rev. Immunol. 2005; 5(4): 296–306.
2. Nestle F.O., Farkas A., Conrad C. Dendritic–cell–based therapeutic vaccination against cancer. Curr. Opin. Immunol. 2005; 17(2): 163–9.
3. Dalerba P., Cho R.W., Clarke M.F. Cancer Stem Cells: Model and Concepts. Annu. Rev. Med. 2007; 58: 18.1–18.18.

Подготовил А.В. Берсенёв
По материалам: Cancer Res. 2006; 66: 10247–52

Технология получения партеногенетических линий эмбриональных стволовых клеток комбинацией с методом переноса ядра

Партеногенез – это процесс образования эмбриона из яйцеклетки, не оплодотворенной сперматозоидом. У некоторых животных этот процесс наблюдается в природе, но ни один вид млекопитающих не способен размножаться таким образом. Основные причины остановки развития – нарушение экспрессии генов из–за неправильной картины импринтинга [1]. Геномный импринтинг – одна из форм регуляции генной экспрессии, при которой транскрипция гена зависит от пола особи, от которой был получен аллель этого гена. Данная регуляция осуществляется посредством метилирования генов. При импринтинге уровень транскрипции некоторых генов определяется полом организма, от которого эти гены унаследованы. В этом случае вклады отцовского и материнского геномов в развитие организмов неодинаковы. Поэтому для нормального развития эмбриона необходим хромосомный материал особей разных полов [2]. В экспериментах на мышах партеногенезом удается получить зародыш из нескольких десятков клеток, очень редко эти эмбрионы развиваются дольше [3]. Впрочем, получение партеногенетического клона – не первостепенная задача ученых. Перспектива использования стволовых клеток партеногенетических эмбрионов (parthenogenetic embryonic stem cells – pESC) в терапевтических целях может решить этические проблемы, связанные с получением эмбриональных стволовых клеток (ESC – ЭСК) и обусловленные созданием и разрушением эмбриона для их получения. ЭСК, полученные из партеногенетических эмбрионов, могли бы иметь большое терапевтическое значение, если бы была показана их способность к дифференцировке, так же, как и ЭСК, полученных обычным путём. Однако, применение pESC в медицине пока невозможно, так как у этих клеток нарушены развитие и способность к дифференцировке. Химерные мыши, полученные при смешении бластомеров нормальных и партеногенетических эмбрионов, задерживались в росте, у них наблюдалось частое образование опухолей [4].

Исследователям из Японии во главе с Takafusa Hikichi удалось повысить жизнеспособность и способность к дифференцировке pESC мыши с помощью технологии переноса ядра (nuclear transfer – NT). Ядро из pESC было перенесено в энуклеированный ооцит, затем из него были получены новые клетки – NT–pESC. Таким образом было получено 84 клеточных линии. Некоторые линии были получены вследствие неоднократного переноса ядра. Все эти линии несли маркеры ЭСК и имели нормальный кариотип. Способность к дифференцировке этих клеток была значительно выше, чем у обычных pESC, что показано серией экспериментов *in vitro* и *in vivo* – в химерных мышах.

Исследователи использовали две различные линии мышей для получения pESC, чтобы избежать нарушений развития, связанных с вырождением. Одна из этих линий – трансгенная – содержала маркёрный белок GFP. Хромосомный материал одного ооцита был перенесен в другой, затем искусственно было запущено развитие. Таким образом были получены партеногенетические эмбрионы, а затем и линии pESC (рис.). Далее их ядра были перенесены в ооциты мыши другой линии и индуцировано развитие. Полученные таким образом ESC имели нормальный кариотип и экспрессировали маркёры плюрипотентности – Oct4, Nanog и другие.

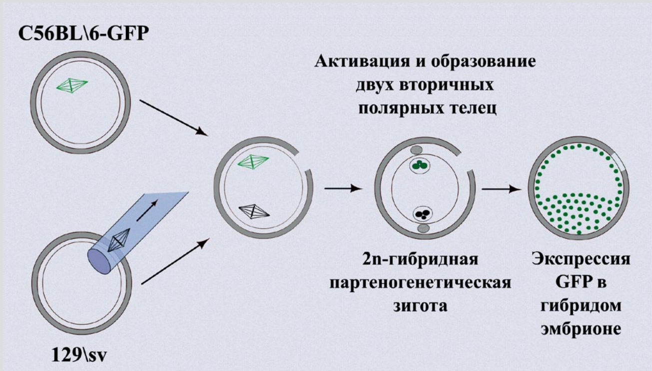

Схема эксперимента Hikichi T., Wakayama T. (с изменениями)

Ученые показали возможность дифференцировки этих клеток *in vitro* в нервную ткань и мезенхиму. В качестве контроля использовали две линии ESC, полученные при обычном оплодотворении. Затем, NT–pESC были использованы для получения химерных мышей. Органы этих мышей проанализировали на содержание клеток NT–pESC и их дериватов (по маркёрному белку). В каждом образце уставливали уровень метилирования импринтированных доменов, которые оказались гипометилированными по сравнению с нормой. При этом клетки NT–pESC химеризовали органы и дифференцировались в тканях мышей.

Таким образом, японская группа исследователей показала положительное влияние процедуры переноса ядра на потенциал развития партеногенетических ЭСК. Интересно, что в полученных линиях NT–pESC не наблюдали феномена потери X–хромосомы, что обычно бывает при партеногенезе. В данном эксперименте все кариотипические и эпигенетические характеристики линий сохранялись, как и у pESC, на протяжении нескольких пассажей (до 30). Кроме того, уровень успешного образования клеточных линий после переноса ядра партогенетической клетки в ооцит был в полтора–два раза выше, чем при получении NT–ESC, когда донором ядра были соматические клетки или нормальные ESC. Причины этого неясны. Можно предположить, что улучшенное развитие, дифференцировка и жизнеспособность этих клеток явились следствием отбора самых лучших клеток для донорства ядра и цитоплазмы, и этот отбор производился неоднократно в течение двух и более переносов генетического материала в ооцит. Возможно также, что здесь наблюдается влияние новой цитоплазмы ооцита на ядро. В любом случае, положительный эффект переноса ядра на жизнеспособность и потенциал развития клеток NT–pESC был подтвержден серией экспериментов. Причины изменений потенциала развития еще предстоит выяснить. Использование партеногенетических клеток в медицине имеет многообещающие перспективы. Несмотря на генетические нарушения и аномальность развития этих клеток по сравнению с ESC, исследования в этой области имеют также и большое фундаментальное значение.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Surani M.A., Barton S.C., Norris M.L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. Nature 1984; 308(5959): 548–50.
2. McGrath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. Cell 1984; 37(1): 179–83.
3. Kaufman M.H., Barton S.C., Surani M.A. Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. Nature 1977; 265(5589): 53–5.
4. Holm T.M., Jackson–Grusby L., Brambrink T. et al. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. Cancer Cell 2005; 8(4): 275–85.

Подготовила Т. Лопатина
По материалам: Stem Cells 2007; 25; 1: 46–53

Создание гистосовместимых эмбриональных стволовых клеток методом партеногенеза

Генетически совместимые плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки, созданные методами переноса ядра и/или с помощью партеногенеза (пЭСК), могут являться потенциальным источником тканей для трансплантации при различных заболеваниях.

Результатом партеногенеза у многих животных является развитие нормального эмбриона без предварительного оплодотворения овоцита. Однако грызуны не относятся к таким видам, так как их пренатальное развитие требует экспрессии генов отцовского генома (пронуклеуса). Ранее сообщалось о получении пЭСК из партеногенетических бластоцист мышей и приматов [1, 2]. При развитии таких животных наблюдалось явление партеногенетического химеризма. У человека такое явление было описано при получении партеногенетических клеток кожи и гематопоэтической системы [3]. В 2004 году японской группой Tomohiro Kono впервые была показана возможность рождения жизнеспособного потомства из партеногенетически развитых эмбрионов мыши [4].

Экспериментальный партеногенез у грызунов представляет собой остановку деления клеток во второй фазе мейоза, с последующей стимуляцией специальными агентами в присутствии цитохалазина, который предотвращает процесс выброса полярного тельца из ооцита. Таким образом сохраняется диплоидность, и «псевдозигота» может развиться в бластоцисту, из которой и выделяются пЭСК. ПЭСК несут удвоившиеся гаплоидные клетки, то есть они преимущественно гомозиготны. Ткани, полученные из гомозиготных клеток, будут нести один из двух родительских наборов генов гистосовместимости и, теоретически, они будут предпочтительнее для пересадки, поскольку риск их отторжения будет значительно снижен. Однако, у гетерозиготных пациентов МНС – гомозиготные ткани могут атаковаться натуральными киллерами, которые распознают нехватку одного из наборов антигенов гистосовместимости. Этот процесс называется «гибридная устойчивость» и часто проявляется при пересадке костного мозга. Поэтому идеальным вариантом была бы пересадка генотипированных МНС–совместимых клеток.

Американские ученые под руководством G. Daley из Harvard Stem Cell Institute (Harvard University, Boston, USA) разработали метод создания гистосовместимых пЭСК. Ученым удалось выделить и охарактеризовать плюрипотентные ЭСК, полученные партеногенезом, в которых поддерживалась экспрессия материнских локусов МНС. Ткани, возникшие из таких клеток, могут пересаживаться животным донорской линии без отторжения.

После партеногенетической активации ооцитов мышей и прерывания (остановки) их деления в первой или второй фазе мейоза пЭСК выделяли и генотипировали. Авторы применяли специально разработанный метод – прямое секвенирование полиморфизмов (SNP– генотипирование) для определения линий пЭСК, которые несут последовательности главного комплекса гистосовместимости (МНС) донорского овоцита. Ткани, полученные после дифференцировки таких