

напоминали примитивную костную ткань и позитивно окрашивались на маркеры – коллаген 2 и ализарин красный. Опухоли продолжали расти, и на 28 день светящиеся клетки обнаруживали в 40–60% площади от общей ткани легкого у 6 из 12 мышей. Подобные образования не были обнаружены в сердце, почках или печени.

Интересно, что при трансплантации клеток от мышей линии Rosa26–LacZ сублетально облученным реципиентам линии B16/129 ни в одном случае не было зафиксировано образование опухолей. Таким образом, предположительно, возникновение новообразований во многом зависит от линии животных (как доноров клеток, так и реципиентов). При пересадке клеток от Rosa26–Lac Z летально облученным NOD/SCID опухоли были обнаружены лишь в одном случае из девяти.

Человеческие ММСК, выделенные из костного мозга или фетальной крови, культивировали в аналогичных условиях, а для трансплантации использовали клетки на 6 и 7 пассажах. Предварительно облученным мышам NOD/SCID вводили внутривенно также два миллиона ММСК. Ни в одном случае ни на одном из сроков исследования не было обнаружено сходных опухолеподобных образований, а количество светящихся клеток со временем снижалось. Таким образом, не было зафиксировано длительного приживания клеток в тканях мышей.

Авторы описывают миграцию и сравнивают динамику приживания и дифференцировки мышинных и человеческих ММСК в паренхиме легких при их системном введении. Уже в течение первых суток клетки мигрируют в легкие и эмболизируют легочные капилляры. В противоположность ожидаемой дифференцировке под влиянием микроокружения, ММСК

демонстрировали остеогенный фенотип и формировали опухолевидные узелки, напоминающие дезорганизованную костную ткань и остеосаркому. Доказательств злокачественного перерождения и истинного опухолевого процесса (таких, как атипичные ядра, опухолевый некроз, слабодифференцированные зоны) авторы не обнаружили. Однако поражения быстро распространялись и разрушали легочную паренхиму и приводили к смерти животных к 28–му дню после трансплантации.

Формирование таких «опухолей», как считают авторы статьи, является характеристикой только мышинных ММСК. Так, в аналогичных экспериментах с человеческими клетками при похожем распределении наблюдали их полное исчезновение из легких со временем. Таким образом, работа вновь ставит под вопрос идентичность ММСК из различных линий животных и от разных видов. Однако, исследователи не дают объяснения подобным видовым различиям.

Точный механизм образования опухолевидных структур предстоит раскрыть в будущем. Однако тот факт, что ММСК мышей способны приобретать значительные хромосомные aberrации при пассировании в культуре теперь уже вызывает сомнений. Тем не менее, данные о способности человеческих ММСК к спонтанной онкогенетической трансформации в культуре, приводимые различными группами, весьма противоречивы.

В связи с перспективой клинических испытаний ММСК, возникает серьезная необходимость в разработке стандартов и протоколов исследования клеток на предмет онкогенетической безопасности перед их введением. Без сомнения, такие работы должны проводиться с использованием хромосомного анализа и одновременной проверки на способность к опухолевому росту.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Tolar J., Nauta A.J., Osborn M.J. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(2): 371–9.
2. Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C. et al. Spontaneous human adult

stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005; 65: 3035–9.

3. Zhou Y.F., Bosch-Marce M., Okuyama H. et al. Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res.* 2006; 66(22): 10849–54.

Подготовила В.С. Мелихова

По материалам: Aguilar S., Nye E., Chan J. Murine but not Human Mesenchymal Stem Cells Generate Osteosarcoma-Like Lesions in the Lung. *Stem Cells. First published online March 15, 2007.*
<http://stemcells.alphaamedpress.org/cgi/reprint/2006-0762v1>.

Гемопозитическая дифференцировка и терапевтический потенциал унипарентных партеногенетических эмбриональных стволовых клеток

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и их дериваты, полученные из партеногенетических эмбрионов, рассматриваются как один из альтернативных источников клеток для аутологичной пациент-специфичной клеточной терапии. Партеногенетические эмбрионы не способны нормально развиваться далее имплантационного периода вследствие нарушения экспрессии импринтированных генов, но предимплантационное развитие у них, как правило, не изменено [1]. Более того, в химерных животных (состоящих из клеток разного происхождения и генотипа) эти клетки встраиваются в ткань и функционируют [2, 3], но нарушение экспрессии импринтированных генов приводит к дефектам развития.

Sigrid Eckardt и коллеги из University of Pennsylvania, использовали методику так называемых унипарентных партеногенетических эмбрионов и исследовали возможность приживания стволовых клеток, выделенных из этих эмбрионов, во взрослом организме.

Унипарентные партеногенетические линии ЭСК были получены методом переноса пронуклеусов: в андрогенетические зиготы был перенесен мужской пронуклеус вместо женского и, наоборот, в гиогенетические зиготы – женский вместо мужского. Из таких зигот были выращены линии, которые использовались для инъекции клеток в нормальную бластоцисту. Созданные таким образом химерные эмбрионы развивались до 14 дней.

Партеногенетические линии несли маркер (GFP), поэтому присутствие клеток можно было определить как в химерных эмбрионах, так и после трансплантации во взрослых тканях. Для восстановления гемопоэза фетальные клетки печени химер (как партеногенетические, так и нормальные) были введены в летально облученную мышь.

Фетальные клетки печени нормальных эмбрионов и партеногенетических химер реконструировали гемопоэз с одинаковой эффективностью. Вклад партеногенетических и нормальных клеток в восстановление гемопоэза оценивали через месяц после трансплантации. Уровень химеризма увеличивался, и через 6–9 месяцев после трансплантации в периферической крови большинство клеток имело партеногенетическое происхождение. Уровень химеризма не зависел от того, были ли клетки андро- или гиногенетические.

Количество нормальных, андро- и гиногенетических GFP-экспрессирующих клеток в лимфоидной, миелоидной и эритроидной популяции было одинаковым. Высокий уровень трансплантированных клеток был в селезенке, тимусе и костном мозге. Были и животные с полностью замещенными клетками. У них клетки крови функционировали нормально. Серийные трансплантации подтвердили способность партеногенетических гемопоэтических клеток к самообновлению. Чтобы проверить, могут ли партеногенетические клетки развиваться при отсутствии нормальных, ученые провели анализ их дифференцировки *in vitro* [4]. Обе партеногенетические линии были способны дать начало гемопоэтическим стволовым клеткам (ГСК) и всем линиям гемопоэтической дифференцировки. Таким образом, авторы не обнаружили различий в приживаемости и функционировании партеногенетических или нормальных ЭСК.

Авторы проанализировали уровень экспрессии импринтированных генов гемопоэтических клеток до трансплантации и после нее. Андрогенетические клетки, изолированные из печени химер, имели более высокий уровень экспрессии генов, экспрессирующихся в норме с отцовских аллелей

(Dlk-1, Igf2, и Peg3) по сравнению с нормальными или гиногенетическими клетками, и меньший – для генов материнских аллелей (Igf2r). Гиногенетические клетки, наоборот, оверэкспрессировали гены, в норме транскрибирующиеся с материнских аллелей. Таким образом, партеногенетические клетки, выделенные из печени химер, имели зависящий от происхождения характер экспрессии импринтированных генов. Анализ партеногенетических клеток, выделенных из взрослых реципиентов, показал нормальную экспрессию импринтированных генов. Используя *real-time RT-PCR*, они оценили уровень транскрипции импринтированных генов этих клеток и клеток периферической крови партеногенетического происхождения. Никаких различий не было между экспрессией импринтированных генов, кроме гена U2af1-rs1. Анализ метилирования импринтированных локусов показал, что даже если есть нарушение метилирования в партеногенетических линиях, то среди клеток реципиента, образованных из этих линий, есть клетки с нормальной картиной метилирования. То есть, происходит изменение метилирования уже в организме при дифференцировке этих клеток.

Таким образом, показана реконструкция гемопоэза у летально облученных мышей после пересадки унипарентных партеногенетических клеток фетальной печени. Гемопоэтическая дифференцировка *in vitro* показывает возможность этих клеток самостоятельно развиваться в ГСК, без влияния нормальных клеток, как это происходит в химерных мышах. В данной работе была показана их способность к пролиферации и даже замещению ткани взрослого органа вне зависимости от того, были ли клетки андро- или гиногенетические. Таким образом, эти клетки можно рассматривать как потенциальный ресурс для трансплантации и регенеративной медицины. Было показано, что эти клетки гистосовместимы по отношению к организму – донору ядра. Для возможного использования партеногенетических ЭСК в клеточной терапии необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Mann J.R., Gadi I., Harbison M.L., Abbondanzo S.J. Androgenetic mouse embryonic stem cells are pluripotent and cause skeletal defects in chimeras: implications for genetic imprinting. *Cell* 1990; 62(2): 251–60.
2. Stevens L.C., Varnum D.S., Eicher E.M.. Viable chimaeras produced from

- normal and parthenogenetic mouse embryos. *Nature* 1977; 269: 515–7.
3. Surani M.A., Barton S.C., Kaufman M.H. Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilised embryos. *Nature* 1977; 270: 601–3.
4. Kennedy M., Keller G.M. Hematopoietic commitment of ES cells in culture. *Methods Enzymol.* 2003; 365: 39–59.

Подготовила Т. Лопатина

По материалам: Eckardt S., Leu N.A., Bradley H.L. et al. Hematopoietic reconstitution with androgenetic and gynogenetic stem cells. *Genes and Dev.* 2007; 21: 409–19.

Ниша злокачественной стволовой клетки – новая мишень терапии рака

Развитие теории канцерогенеза из стволовых клеток опухоли (cancer stem cell, CSC, СКО) в последние годы дало мощный толчок к пониманию механизмов развития рака и разработке новых мишеней терапии злокачественных новообразований. Итак, согласно этой теории, злокачественная опухоль происходит из стволовых клеток, которые несут измененный мутантный геном и появляются по непонятным причинам. Согласно данным различных исследовательских групп, СКО могут происходить из мутировавших нормальных тканевых стволовых или прогениторных клеток

взрослого организма или быть продуктом спонтанного клеточного слияния [1].

Поскольку именно существованию СКО приписывают резистентность к противопухольной терапии и возникновение рецидивов, очень важным является идентификация, описание этих клеток в различных опухолях и поиск их селективных маркеров [1]. Однако, поиск таких маркеров оказался непростой задачей, поскольку фенотипически СКО очень похожи на нормальные взрослые стволовые клетки. Тем не менее, такие маркеры описываются рядом лабораторий [2, 3].