

# ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ПРОБЛЕМА НАПРАВЛЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

© 2008 г.

И. А. ГРИВЕННИКОВ

*Институт молекулярной генетики РАН, Москва*

I. Введение. II. Характеристика и свойства эмбриональных стволовых клеток. III. Направленная дифференцировка эмбриональных стволовых клеток и факторы, влияющие на этот процесс. IV. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

В обзоре будут рассмотрены основные свойства и возможные направления использования эмбриональных стволовых (ЭС) клеток млекопитающих, включая человека. Выделение ЭС клеток мыши и создание соответствующих клеточных линий открыло новые возможности как для изучения биологии развития млекопитающих и функций генов на уровне целого организма, так и механизмов направленной дифференцировки этих клеток с дальнейшей разработкой подходов к клеточной терапии [1, 2].

---

*Принятые сокращения:* ЭС клетки – эмбриональные стволовые клетки; LIF – фактор ингибирующий лейкемию (leukemia inhibitory factor); BMP – морфогенетический белок кости (bone morphogenetic protein); ERK – протеинкиназы, регулируемые внеклеточными сигналами; BDNF – нейротрофический фактор, выделенный из мозга; NT-3 – нейротрофин-3; SSEA – антиген определенных стадий эмбрионального развития; ГСК – гематопозитические стволовые клетки; GFAP – кислый фибриллярный белок глии; NGF – фактор роста нервов; FGF, FGFR – фактор роста фибробластов и его соответствующий рецептор; миРНК – малые интерферирующие РНК; HIF-1 – фактор, индуцированный гипоксией; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; TGF- $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор- $\beta$ .

*Адрес для корреспонденции:* igorag@img.ras.ru

Работа была поддержана грантами Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Министерства образования и науки РФ (ГК № 02.512.12.2013).

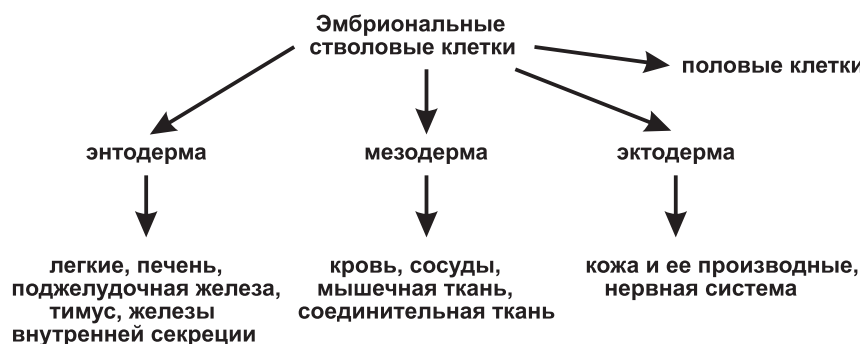


Рис. 1. Основные направления дифференцировки ЭС клеток.

Поэтому основное внимание в настоящем обзоре будет уделено проблемам направленной дифференцировки ЭС клеток в различные клеточные типы и перспективам их использования в практической медицине.

При инъекции в бластоцисты ЭС клетки способны участвовать в образовании всех тканей зародыша, включая генеративные, давая начало развитию химерных животных [3]. Манипуляции с ЭС клетками мыши в сочетании с методом гомологичной рекомбинации, позволяющим направленно изменять геном ЭС клеток, дает возможность создавать трансгенных животных с заданным (измененным) генотипом. Такой подход был впервые осуществлен Томасом и Капеччи [4] в 1987 г., когда на ЭС клетках мыши с помощью гомологичной рекомбинации была продемонстрирована инактивация (нокаутирование) гена. Дальнейшие работы по генетическим модификациям ЭС клеток и целенаправленному изменению структуры генов живых организмов получили международное признание. Наиболее значительный вклад в развитие этого научного направления внесли: М.Капеччи, М.Эванс, О.Смитис. В 2007 г. они были удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины за: «... открытие принципов введения специфических генетических модификаций в мышах с использованием эмбриональных стволовых клеток».

Основными свойствами ЭС клеток являются: их плюрипотентность, то есть способность к дифференцировке во все известные виды соматических клеток, встречающихся в живом организме, в условиях *in vivo* и *in vitro*, а также неограниченный пролиферативный потенциал с сохранением исходного фенотипа [3, 5, 6]. Основные направления дифференцировки ЭС клеток в производные трех зародышевых листков (эктодерму, мезодерму и энтодерму) представлены на рис. 1.

Относительно недавно было показано, что они могут дифференцироваться не только в соматические клетки, но и в клетки зародышевого пути [7–9]. Исходя из этого, в дальнейшем изложении мы будем использовать термин плюрипотентность для ЭС клеток, в отличие от термина мультипотентность, который используется для характеристики стволовых клеток, присутствующих в большинстве тканей взрослого организма и способных к дифференцировке лишь в ограниченное количество видов клеток.

В настоящее время выделяют три типа ЭС клеток млекопитающих:

1. Клетки, изолированные из внутренней клеточной массы бластоцисты млекопитающих [1, 2]. Именно эти клетки принято называть ЭС клетками.

2. Клетки эмбриональных карцином, впервые полученные из тератокарцином, состоящие из смеси дифференцированных клеток различных зародышевых слоев и недифференцированных стволовых клеток [10]. Явным недостатком, ограничивающим использование этих клеток являются кариотипическая нестабильность и низкая степень участия в эмбриональном развитии при переносе их в бластоцисту реципиентов.

3. Первичные половые клетки зародыша [11, 12]. ЭС клетки, обладающие высокой пролиферативной активностью и способные при определенных условиях в течение длительного времени поддерживаться в культуре в недифференцированном состоянии.

Для сохранения недифференцированного фенотипа ЭС клеток в культуре требуется наличие так называемого фидерного, или питающего слоя, который может быть представлен первичными эмбриональными фибробластами или перевиваемыми фибробластами мыши линии STO [1]. На рис. 2 показаны ЭС клетки мыши, растущие на фидере из эмбриональных фибробластов мыши.

Все описанные к настоящему времени линии ЭС клеток сходны по своим морфологическим характеристикам: все они имеют крупное ядро, содержащее преимущественно эухроматин и несколько ядрышек. Им свойственно высокое ядерно-цитоплазматическое отношение – цитоплазма представлена узким ободком, окружающим ядро.

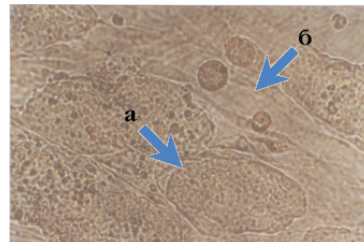


Рис. 2. Колонии ЭС клеток мыши на фидерном слое из эмбриональных фибробластов мыши.

а – колонии, сформированные ЭС клетками; б – клетки фидерного слоя (x400).

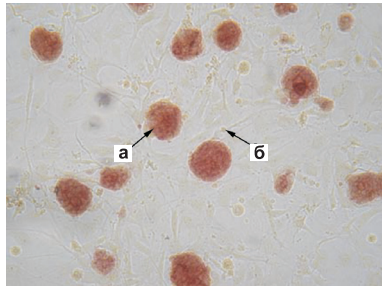


Рис. 3. Выявление активности щелочной фосфатазы в культурах ЭС клеток мыши, растущих на фидерном слое из эмбриональных фибробластов мыши (x200).

а – окрашенные колонии, сформированные ЭС клетками; б – неокрашенные клетки фидерного слоя.

Особенностью ЭС клеток является высокая активность эндогенной щелочной фосфатазы (рис. 3), служащая одним из общепринятых тестов, который свидетельствует о сохранении этими клетками плюрипотентного статуса.

На рис. 3 видно, что окрашиваются колонии, сформированные недифференцированными ЭС клетками. Клетки фидерного слоя не дают положительной реакции на активность щелочной фосфатазы. Для ЭС клеток характерен также высокий уровень теломеразной активности, который коррелирует со степенью их недифференцированного состояния.

Ниже рассмотрим свойства некоторых наиболее изученных ЭС клеток и путей их дифференцировки.

## II. ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

### ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ

Первые линии ЭС клеток мыши были получены в начале 80-х годов XX века [1, 2]. Большинство из них были выделены из эмбрионов мышей на стадии бластоцисты инбредной линии 129/Sv. Такими линиями являются ЭС клетки линий: R1, W9.5, АВ-1, СР-1, ССЕ, СС.1, РJ1-5, Е14, D3 [13]. Кариотипический анализ 35 линий ЭС клеток мыши показал, что 25 из них имеют кариотип ХУ, а остальные ХО и ХХ. Предполагается, что ЭС клетки предпочтительней образуются из клеток с мужским кариотипом, так как вторая Х хромосома может быть дестабилизатором плюрипотентности [14]. В основном все ЭС клетки имеют нормальный кариотип ( $2n=40$ ), а его изменения ведут к потере плюрипотентности [15].

ЭС клетки мыши обладают высокой пролиферативной активностью и способностью поддерживаться в недифференцированном состоянии в течение длительного времени в культуре, при этом, как указывалось выше, они сохраняют нормальный и стабильный кариотип. Для ЭС клеток мыши характерно относительно короткое

время удвоения клеточной популяции (примерно 12–15 ч), с очень короткой фазой G1. В этих популяциях преобладают клетки среднего размера (10–12 мкм); при пересеве они проявляют адгезивные и пролиферативные свойства, и, контактируя с фидером, формируют нормальные по внешнему виду монослойные колонии, способные при определенных условиях к дифференцировке в эмбрионидные тела. В начале дифференцировки ЭС клеток происходит возрастание экспрессии циклина D, удлиняется G1-фаза и, естественно, замедляется скорость клеточных делений [16].

Как уже отмечалось, для сохранения недифференцированного фенотипа ЭС клеток мыши в условиях *in vitro* клетки культивируют на фидерном слое, в качестве которого обычно используют первичные эмбриональные фибробласты, инактивированные митомицином С или гамма-облучением. Другой метод предупреждения дифференцировки ЭС клеток заключается в добавлении в культуральную среду (в отсутствие фидерного слоя) специфического ростового фактора LIF (фактор, ингибирующий лейкемию).

#### *Некоторые свойства фактора, ингибирующего лейкемию*

LIF относится к классу цитокинов и представляет собой гемопоэтический регулятор, индуцирующий дифференцировку клеток миелоидной лейкемии линии M1. Установлено, что клетки фидера из первичных эмбриональных фибробластов сами продуцируют LIF, обеспечивая этим поддержание недифференцированного состояния ЭС клеток [17]. В присутствии эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота рекомбинантный LIF может частично выполнять функции фидерного слоя, обеспечивая рост и пролиферацию ЭС клеток [6].

LIF является членом семейства интерлейкина-6 (IL-6), к которому относятся также: интерлейкин-11 (IL-11), онкостатин М, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) и кардиотрофин (СТ-1).

Действие LIF на клетки осуществляется посредством его взаимодействия с соответствующим рецептором, представленным на плазматических мембранах гетеродимерным комплексом белков gp130 и LIFR. Вначале LIF взаимодействует со своим рецептором LIFR, затем с gp130, формируя, таким образом, тримерный комплекс [18], активирующий сигнальный путь транскрипционного фактора STAT3. Последний считается одним из основных в поддержании плюрипотентности ЭС клеток [19, 20]. Помимо сигнального пути, связанного с транскрипционным фактором STAT3, в поддержании недифференцированного статуса ЭС клеток может быть вовлечен

ВМР-SMAD путь. Недавно было показано, что в среде, не содержащей сыворотки, LIF способен блокировать нейрональную дифференцировку ЭС клеток мыши, сохраняя их плюрипотентность лишь в слабой степени. Однако совместное действие LIF и ВМР сохраняет плюрипотентность ЭС клеток. Авторы предполагают, что основной вклад ВМР связан с индукцией экспрессии Id генов с участием SMAD пути [21]. Следует также отметить, что существуют еще два пути, обеспечивающие поддержание недифференцированного состояния ЭС клеток: сигнальный путь ERK и Wnt-1 [22, 23].

*Поверхностные антигены и поддержание плюрипотентности*

Для ЭС клеток мыши характерна способность к экспрессии поверхностного антигена SSEA-1, прослеживаемая начиная с восьмиклеточной стадии эмбриона мыши до клеток внутренней клеточной массы бластоцисты [24].

На рис. 4 показана иммунофлуоресцентная детекция SSEA-1 антигена на поверхности ЭС клеток мыши. Полная окраска кластеров клеток свидетельствует о том, что большинство клеток находится в недифференцированном состоянии и сохраняет свои плюрипотентные свойства. Ранее для подтверждения недифференцированного фенотипа ЭС клеток мыши использовали маркер ЕСМА-7, а для дифференцирующихся – маркер ТРОМА-1. Как уже отмечалось, ЭС клетки мыши отличаются высоким уровнем экспрессии эндогенной щелочной фосфатазы (см. рис. 3) и теломеразы, которая необходима для поддержания их пролиферативной активности [25, 26].

В наших совместных экспериментах с коллегами из Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова впервые были обнаружены кальциевые каналы в ЭС клетках мыши и исследованы их характеристики [27]. Было установлено, что на поверхности ЭС клеток практически отсутствуют потенциалзависимые ионные каналы. В то же время полученные результаты свидетельствовали о наличии в ЭС клетках внутриклеточного депо кальция большой емкости, на которое оказывал

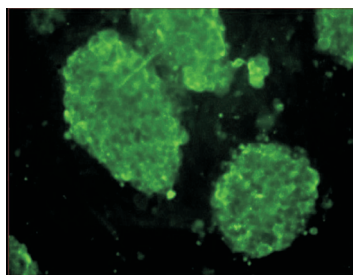


Рис. 4. Иммунофлуоресцентная детекция SSEA-1 антигена в культурах ЭС клеток мыши, растущих на фидерном слое из эмбриональных фибробластов мыши (x400).

влияние тапсигаргин (специфический ингибитор кальциевой АТФазы внутриклеточных кальциевых депо). Риадин-чувствительное депо развито в этих клетках относительно слабо.



Для сохранения плюрипотентности ЭС клеток мыши необходима экспрессия ряда транскрипционных факторов, в частности Oct-4, Nanog, Rex-1 [28–31]. Oct-4 – член семейства POU-белков, необходимый для формирования внутренней клеточной массы бластоцист, экспрессируется на ранних стадиях развития эмбрионов мыши [32]. Однако при повышении его экспрессии происходит дифференцировка ЭС клеток в мезодермальном и эндодермальном направлении, а его отсутствие приводит к образованию трофэктодермы [28]. Транскрипционный фактор Nanog также участвует в поддержании плюрипотентности ЭС клеток мыши; повышение его экспрессии способствует сохранению недифференцированного состояния ЭС клеток в отсутствие фактора LIF и соответствующей активации фактора STAT3. Сохранение плюрипотентности ЭС клеток с повышенной экспрессией Nanog в отсутствие фактора LIF требует экспрессии Oct-4, так как при отсутствии последнего клетки начинают дифференцироваться [31, 33]. Гордеевой с сотр. [30] был проведен сравнительный анализ экспрессии гомеобоксодержащих транскрипционных факторов Oct-4, Pax-6, Pbx-1, Pbx-2 в ЭС клетках мыши. В этой работе была впервые выявлена экспрессия генов Pbx-1, Pbx-2 на начальных стадиях дифференцировки клеток, что может свидетельствовать о важной роли этих генов в эмбриогенезе.

Относительно недавно было установлено, что некоторые нейротрофины (BDNF, NT-3 и NT-4) способны поддерживать как пролиферацию, так и плюрипотентность ЭС клеток человека в культуре; кроме того, обнаружено, что они предотвращают апоптоз этих клеток [34]. Эффекты нейротрофинов на клетки осуществляются через сигнальный путь передачи информации, включающий, в частности, активацию фосфатидилинозитол-3-киназы.

#### *Формирование эмбрионидных тел.*

##### *Начальные стадии дифференцировки*

В отсутствие фидерного слоя и фактора LIF ЭС клетки формируют эмбрионидные тела, которые представляют собой зачатки эндодермы, эктодермы и мезодермы, напоминая при этом постимплантационное эмбриональное развитие. После прикрепления эмбрионидного тела к адгезивному субстрату разрушается система плотных контактов между поверхностными клетками, что влечет за собой нарушение целостности базальной мембраны и установлению контакта внутренних клеток с подложкой. Затем происходит миграция внутренних клеток из эмбрионидного тела и их активная пролиферация с последующей диф-

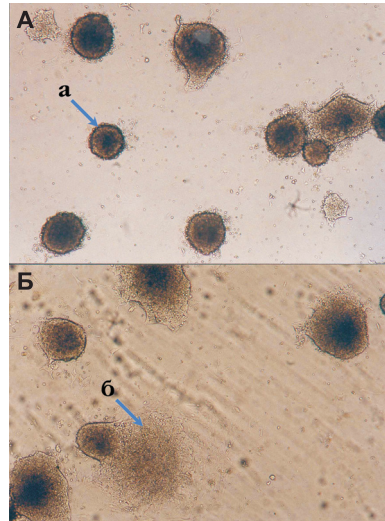


Рис. 5. Эмбрионные тела, полученные из ЭС клеток мыши в культуре (x200).

А. Эмбрионные тела на 3–4 сутки после прикрепления к желатиновой подложке; а – эмбрионное тело.

Б. Начало миграции клеток из эмбрионных тел; б – стрелкой показаны клетки, мигрирующие из эмбрионного тела после разрыва внешней оболочки.

ференцировкой в широкий спектр тканей, такие как мышечная, нервная, эпителиальная и др. [6]. ЭС клетки мыши способны формировать эмбрионные тела двух типов: простые и цистические [5, 35].

На рис. 5 (а, б) представлены эмбрионные тела, сформированные ЭС клетками мыши, растущие на желатиновой подложке, а также начальные этапы дифференцировки этих клеток, сопровождающиеся разрывом оболочки эмбрионного тела и миграцией клеток из внутренней полости по подложке [46].

Следует отметить, что дифференцировка ЭС клеток может происходить как спонтанно, так и под действием ряда ростовых факторов и различных химических соединений. Способность ЭС клеток к дифференцировке *in vitro* позволяет использовать их как модель для исследования процессов эмбриогенеза и соответствующей клеточной дифференцировки в разные типы тканей.

#### ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Колоссальным достижением конца 90-х годов прошлого века явилось получение и выведение в культуру ЭС клеток человека. Клетки были выделены из предимплантационных бластоцист, оплодотворенных *in vitro* путем извлечения из них внутренней клеточной массы, которую затем помещали на фидерный слой, с последующим наращиванием клеток, из которых уже в дальнейшем получали соответствующие клеточные линии [25, 36–39].

На рис. 6 представлены ЭС клетки человека, растущие на фидерном слое эмбриональных фибробластов мыши.

При инъекции иммунодефицитным мышам линии SCID под капсулу семенника ЭС клетки человека образовывали тератомы,



содержащие производные всех трех зародышевых листков [25, 36]. Плюрипотентность ЭС клеток человека также поддерживается транскрипционными факторами Oct-4 и Nanog [33]. Аналогично ЭС клеткам мыши, ЭС клетки человека в течение продолжительного времени культивирования сохраняют плюрипотентность, высокую пролиферативную активность и, что особенно, важно нормальный кариотип (46XX/XY) [40]. Для этих клеток также характерна высокая активность эндогенной щелочной фосфатазы и теломеразы [25, 37]. Однако существует и ряд различий между ЭС клетками мыши и человека. Некоторые из них представлены в табл. 1.

ЭС клетки человека в отличие от клеток мыши формируют только цистические эмбриоидные тела. Недифференцированные ЭС клетки человека экспрессируют специфические поверхностные антигены SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 [25, 37, 41] и не экспрессируют антиген SSEA-1, характерный для ЭС клеток мыши. Удвоение клеточной популяции ЭС клеток человека составляет от 30 до 35 ч, что намного дольше, чем для ЭС клеток мыши (12–15 ч) [40]. Для пересева ЭС клеток мыши в большинстве случаев используют трипсин, а для клеток человека применяется в основном механический метод диссоциации, так как ферментативная обработка этих клеток нередко приводит к хромосомным aberrациям [35]. Правда, относительно недавно было продемонстрировано получение 17 линий ЭС клеток человека с нормальным кариотипом при ферментативной обработке клеток [42]. При культивировании ЭС клеток человека *in vitro* также достаточно часто используется фидер из мышинных эмбриональных фибробластов, который выделяет необходимые для них факторы роста. Однако было показано, что LIF лишь слабо тормозит дифференцировку этих клеток, несмотря на то, что в ЭС клетках человека происходит активация LIF/STAT3-сигнального пути, но она, видимо, недостаточна для сохранения плюрипотентного статуса этих клеток [25, 36, 43]. Главное отличие

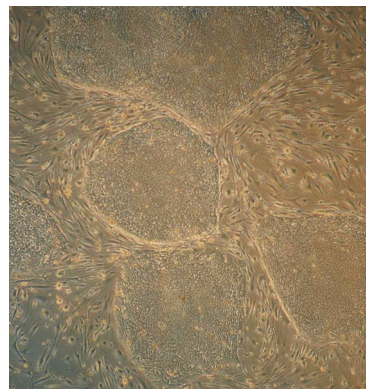


Рис. 6. Колонии ЭС клеток человека линии hESM03, растущие на фидерном слое из эмбриональных фибробластов мыши (x400). Фотография любезно предоставлена сотрудником Института общей генетики РАН М.А. Лагарьковой.

Таблица. 1.  
Сравнение некоторых свойств ЭС клеток мыши и человека

Свойства и маркеры клеток	ЭС клеток мыши	ЭС клеток человека	Источник литературы
Ost-4	+	+	[24, 25, 28–30]
Nanog	+	+	[28, 31, 33, 36]
SSEA-1	+	–	[24, 25, 41]
SSEA-3/4	–	+	[25, 37, 41]
TRA-1-60/81	–	–	[25, 37, 41]
LIF-рецептор	+	±	[6, 19, 20, 25, 36]
Щелочная фосфатаза	+	+	[25, 26]
Теломеразная активность	+	+	[25, 26]
Образование эмбрионидных тел	Простые, цистические	Цистические	[5, 29, 30, 35]

ЭС клеток человека заключается в том, что они спонтанно или под действием BMP-4 способны дифференцироваться в клетки трофэктодермы [25, 44]. По-видимому, внутренняя клеточная масса бластоцисты человека может сохранять способность к генерации трофэктодермы. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что снижение уровня экспрессии Ost4 в ЭС клетках человека приводит к повышению экспрессии трофэктодермальных (таких, как Cdx2) и экстраэмбриональных эндодермальных маркеров, таких как GATA-6 [45]. Подавление экспрессии гена Nanog с помощью РНК интерференции также сопровождалось повышенной экспрессией трофэктодермальных маркеров в этих клетках [46].

Для использования в перспективе ЭС клеток человека в клеточной терапии необходимо соблюдать очень строгие условия их культивирования. Полностью должна быть исключена возможность заражения клеток человека патогенными микроорганизмами и ретровирусами, другими патогенами, которые могут присутствовать как в эмбриональной сыворотке, так и в клетках фидерного слоя. В связи с этим в настоящее время проводятся интенсивные работы по получению новых линий ЭС клеток человека, способных расти на безфидерной подложке с использованием синтетических сред с заменителями сыворотки, что существенным образом позволяет стандартизовать процедуру культивирования [48].

## ДРУГИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Плюрипотентные стволовые клетки были получены и из других животных, таких как курица [48], хомячок [49], кролик [50], крыса [51, 52], норка [53], свинья [54], овца [55], из крупного рогатого скота [56–58] и ряда приматов [59–63].

Однако только ЭС клетки цыпленка и мыши способны дифференцироваться в клетки зародышевого пути. Для развития исследований на ЭС клетках человека важно было иметь линии ЭС клеток и из других приматов. ЭС клетки обезьян характеризуются типичными маркерами ЭС клеток человека, сохраняя нормальный кариотип и высокую пролиферативную активность *in vitro* [60]. Эти линии могут служить удобной модельной системой для исследования ЭС клеток человека. Кроме того, линия ЭС клеток обезьяны (Суно-1), выделенная из бластоцисты, полученной партеногенетическим путем *in vivo*, проявила многие свойства, присущие ЭС клеткам человека – высокую активность теломеразы и щелочной фосфатазы, экспрессию соответствующих клеточных маркеров (Oct-4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81) и способность дифференцироваться в различные типы клеток. Эти результаты позволяют надеяться, что ЭС клетки, полученные партеногенетическим путем, могут служить источником для аутологической терапии, исключая необходимость создания эмбрионов. Однако использование линий, полученных этим способом, имеет и свои ограничения, поскольку в них могут происходить нарушения в экспрессии генов импринтинга [65].

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭС КЛЕТОК

ЭС клетки в настоящее время используются как в сугубо фундаментальных научных исследованиях, так и в прикладных целях (рис. 7).

Со времени открытия ЭС клетки использовали для исследования начальных этапов эмбрионального развития различных видов живых существ, особенно млекопитающих, а также, в последнее время, для их клонирования. В ряде экспериментов было продемонстрировано, что ЭС клетки *in vitro* в основном повторяют все стадии начального развития, которые протекают в нормальном эмбрионе *in vivo*.

ЭС клетки были с успехом применены для получения химерных животных. Как уже упоминалось, на модели ЭС клеток мыши были в основном разработаны методы гомологичной рекомбинации, которые позволили чрезвычайно точно вносить изменения в геном живых клеток и затем наблюдать за функциями измененных генов уже на уровне целого организма [4, 13].

Наиболее интенсивно развивающимся направлением применения ЭС клеток в последние годы является их направленная дифферен-

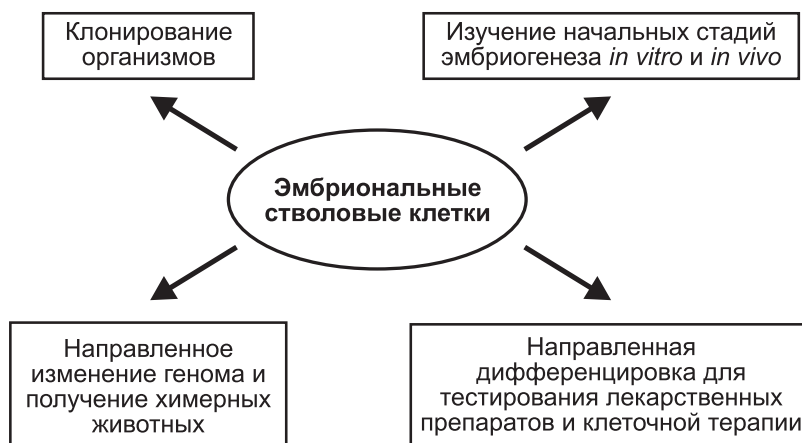


Рис. 7. Направления использования ЭС клеток в биологии и медицине.

цировка в определенные типы клеток. Особенно это касается клеток человека, что связано, как указано на рис. 7, с возможностью их применения как для клеточной трансплантации, так и для создания клеточных моделей для тестирования лекарственных препаратов.

### III. НАПРАВЛЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС

Исследование дифференцировки ЭС клеток и особенно их направленной дифференцировки в определенные виды клеток живых организмов представляет не только чисто научный теоретический интерес, но и дает надежду на разработку в перспективе методов клеточной или тканевой терапии разнообразных тяжелых заболеваний человека.

Остановимся на некоторых подходах к регуляции дифференцировки ЭС клеток, которые суммированы на рис. 8.

Надо отметить, что если на первых этапах развития этих подходов основное внимание уделялось поиску и использованию различных факторов роста и дифференцировки, то в последние годы все большее и большее внимание уделяется генетическим модификациям ЭС клеток для индукции определенных видов клеточной дифференцировки.

Ниже приведен перечень условий, которые следует выполнять при разработке подходов к направленной дифференцировке ЭС клеток

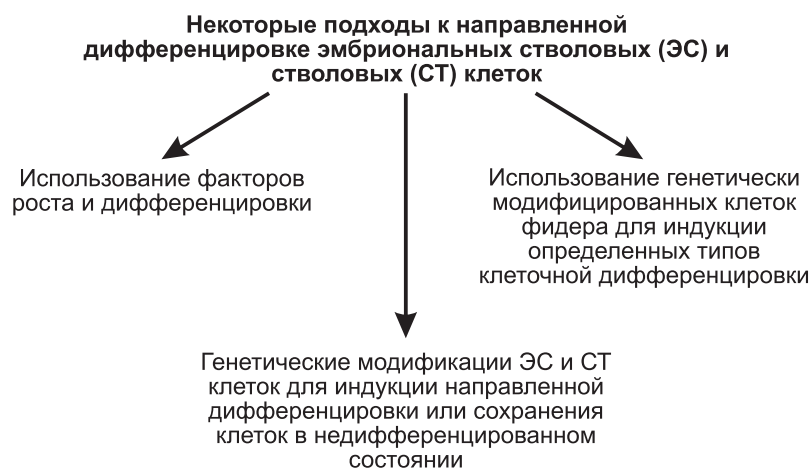


Рис. 8. Способы индукции направленной дифференцировки ЭС клеток *in vitro*.

для их дальнейшего использования при трансплантации соответствующему реципиенту (в частности, человеку):

1. Необходимо обеспечить возможность наращивания большого количества недифференцированных ЭС клеток.

2. На следующем этапе необходимо провести дифференцировку клеток и получить максимально возможное количество клеток определенного типа (в идеале их гомогенную популяцию), пригодных для трансплантации.

3. Для решения указанных выше задач необходима разработка стандартизированных условий как наращивания ЭС клеток, так и их последующей дифференцировки, без которых невозможно получение воспроизводимых результатов.

Для изучения путей направленной дифференцировки ЭС клеток и влияния клеточного окружения на этот процесс *in vivo* используют их пересадку в различные органы взрослых животных (мозг, печень, сердце и т.д.) с последующим наблюдением за судьбой этих клеток. С этой целью используют так называемые маркированные с помощью флуоресцентных белков линии ЭС клеток. Клетки, экспрессирующие такие белки, легко детектируются на срезах органов и тканей с помощью флуоресцентной микроскопии.

На рис. 9 показаны ЭС клетки линии R1, трансфицированные плазмидами, содержащими гены разных флуоресцентных белков: «зеленого», «красного» и «синего». Чрезвычайно перспективным является использование генов, находящихся под регулируемыми

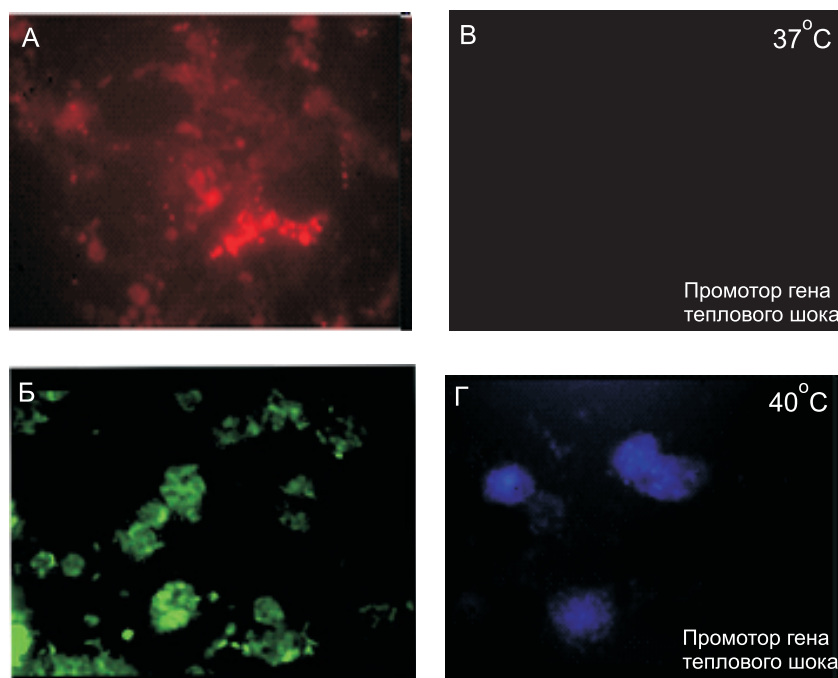


Рис. 9. ЭС клетки мыши линии R1, трансфицированные векторами, несущими гены «цветных» белков. (Данные получены в сотрудничестве с Л.И. Корочкиным и его коллегами из Института биологии гена РАН).

А. ЭС клетки, трансфицированные плазмидой, несущей ген «красного» белка под контролем цитомегаловирусного промотора.

Б. ЭС клетки, трансфицированные плазмидой, несущей ген «зеленого» белка под контролем цитомегаловирусного промотора.

В и Г. ЭС клетки, трансфицированные плазмидой, несущей ген «синего» белка под контролем промотора белка теплового шока. В. Клетки, растущие при температуре 37°C.

Г. Те же клетки после их инкубации при температуре 40°C (x200).

промоторами. В частности, на рис. 9 (В, Г) показана экспрессия «синего» белка, находящегося под контролем промотора гена белка «теплового шока». На рисунке видно отсутствие окраски трансфицированных клеток при их инкубации при 37°C и появление синего свечения при инкубации культур клеток при 40°C [66].



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОК ФИДЕРНОГО СЛОЯ

Клетки фидерного слоя могут быть с успехом применены для индукции дифференцировки ЭС клеток, что не так давно было продемонстрировано в работе Шмита с соавт. [67].

ЭС клетки мыши культивировали на подложке стромальных клеток линии OP9, экспрессирующих дельта-1 лиганд, необходимый для активации соответствующих Notch рецепторов, присутствующих на ЭС клетках. В ходе экспериментов авторам удалось добиться дифференцировки клеток в Т-лимфоциты, которые экспрессировали на своей поверхности специфические для этого типа клеток маркеры. Более того, функциональность полученных Т-лимфоцитов была доказана при их трансплантации иммунодефицитным мышам-реципиентам, лишенным этих клеток. Таким образом, данный подход представляется достаточно перспективным, как с точки зрения возможности наращивания неограниченного числа клеток, необходимых для эксперимента, так и возможности добиваться их дифференцировки в заданном направлении с большим выходом «нужных» клеток.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

В настоящее время для индукции дифференцировки ЭС клеток по определенному пути широко используются различные химические соединения. Одним из первых соединений такого ряда была ретиноевая кислота – производное витамина А. Интересно отметить, что разные концентрации ретиноевой кислоты определяют преимущественную дифференцировку ЭС клеток либо в нейрональном, либо в миогенном направлении.

На рис. 10 показана дифференцировка ЭС клеток мыши в нейрональном направлении под действием ретиноевой кислоты (1 мкМ), добавленной к клеточным культурам на стадии образования эмбриоидных тел.

Исследования генетического контроля миогенной и эпителиальной дифференцировки ЭС клеток показало, что последовательность

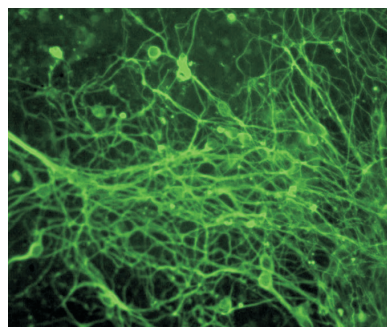


Рис. 10. Индукция нейрональной дифференцировки в культуре ЭС клеток мыши после их обработки ретиноевой кислотой (1 мкМ). Иммунофлуоресцентная детекция клеток с помощью антител против  $\beta$ -III-тубулина (x200).

экспрессии тканеспецифических генов в них такая же, как и в процессе нормального развития [68, 69].

Ниже будут рассмотрены пути и способы дифференцировки этих клеток в некоторые клеточные виды под действием факторов роста и дифференцировки.

#### *Дифференцировка в кардиомиоциты*

Известно, что в ведущих странах мира, таких как США, Россия, Китай и Индия, смертность от сердечно-сосудистых заболеваний занимает первое место. Так, например, от этих болезней в нашей стране в год умирает до 1 000 000 человек. Поэтому одним из важных направлений индукции дифференцировки ЭС клеток является получение кардиомиоцитов *in vitro*. Это связано с потенциальной возможностью наработки достаточно больших количеств клеток для заместительной терапии при тяжелых патологиях сердечной мышцы. Важно отметить, что дифференцировку ЭС клеток в кардиомиоциты *in vitro* достаточно просто наблюдать по появлению спонтанно сокращающихся кластеров клеток. В большинстве современных протоколов, описывающих дифференцировку ЭС клеток в кардиомиоциты, начальные стадии манипулирования с клетками включают стадию получения эмбрионидных тел в отсутствие LIF [70].

Существует несколько факторов, влияющих на дифференцировку ЭС клеток в кардиомиоциты: тип линии ЭС клеток, исходное количество клеток в эмбрионидном теле, состав среды, наличие сыворотки, ростовых факторов и других добавок, а также время посева эмбрионидных тел. Среди условий, способствующих дифференцировке ЭС клеток мышцы и человека в кардиогенном направлении, следует отметить следующие: ретиноевую кислоту (10 нМ) [71], диметилсульфоксид (0,5–1,5%) [72], 5-азодезоксицитидин [73] и аскорбиновую кислоту [74]. Относительно недавно было обнаружено стимулирующее действие окиси азота на дифференцировку ЭС клеток мышцы в кардиомиоциты [75]. На начальных стадиях наблюдается быстрое увеличение областей спонтанных сокращений с последующим уменьшением скорости сокращений. В зависимости от количества клеток на начальных стадиях и их агрегации изменения в скорости спонтанных сокращений могут продолжаться от нескольких дней до 1 месяца. Важно понимать, что полностью дифференцированные кардиомиоциты часто прекращают спонтанные сокращения, при этом они могут поддерживаться в культуре длительное время. Таким образом, в зависимости от длительности культивирования условно можно выделить три стадии дифференцировки: раннюю (появление пейсмекер-подобных

клеток и первичных кардиомиоцитов), промежуточную и терминальную дифференцированные клетки желудочка и предсердия). Были разработаны как методы дифференцировки ЭС клеток в кардиомиоциты, так и способы получения обогащенных кардиомиоцитами популяций дифференцирующихся клеток [76].

#### *Дифференцировка в клетки нервной системы*

В настоящее время достаточно хорошо изучена направленная дифференцировка ЭС клеток по эктодермальному пути, по которому протекает и дифференцировка клеток нервной системы. Больше всего исследований ведется по получению из ЭС клеток нервной ткани. Кроме этого, были получены и другие элементы эктодермы, а именно клетки, экспрессирующие маркеры кератиноцитов [69]. Из этих клеток удалось получить структуры, похожие на кожу эмбрионов, что говорит об их способности нормально функционировать в составе ткани [77]. Образование клеток кожных тканей регулируется, в частности, посредством фактора BMP4 [78]. Интересно отметить, что добавление BMP4 к культуре клеток, дифференцирующихся по нейроэктодермальному пути, приводит к ингибированию развития нервной ткани и дифференцировке клеток в кератиноциты.

Дифференцировка ЭС клеток по нейроэктодермальному пути чрезвычайно трудна для изучения по нескольким причинам, обусловленным в значительной степени чрезвычайной сложностью строения нервной системы млекопитающих. Вместе с тем, учитывая практическую невозможность изучения начальных этапов дифференцирующихся по нейроэктодермальному пути клеток *in vivo*, особенно у человека, ЭС клетки следует считать уникальной моделью этих процессов, так как при своей дифференцировке в нейроглиальном направлении *in vitro* они проходят те же стадии, что и при развитии *in vivo* [79, 80].

Следует иметь в виду, что при таком направлении дифференцировки происходит образование клеток разных типов: собственно нейронов и глиальных клеток. Кроме того, из так называемого «общего пула» предшественников глиальных клеток в последствии образуются разные дифференцированные клетки, такие как астроциты (также подразделяющиеся на несколько видов), олигодендроциты и клетки Шванна. Популяция собственно нейронов, образовавшихся в ходе дифференцировки, также не однородна – она состоит из нейронов различной эргичности, включающей дофаминергические, холинергические, ГАМК-ергические, глутаматергические нейроны и т.д. В этом плане дифференцировка ЭС клеток в кардиомиоциты представляется более «простой» задачей.

Если рассматривать направленную дифференцировку ЭС клеток, и особенно ЭС клеток человека, в качестве источника для их последующей трансплантации в мозг, то становятся понятными жесткие критерии, предъявляемые к методическим регламентам такой дифференцировки.

Дифференцировку ЭС клеток человека в нейрональном направлении удалось получить в системе искусственных трехмерных носителей, состоящих из полигидроксиэфиров [81]. Совместная обработка ЭС клеток NGF (фактор роста нервов) и NT-3 (нейротрофин-3) в такой системе приводила к существенному увеличению количества как нестин-положительных (нейрональные предшественники), так и бета-III-тубулин-положительных клеток (собственно нейроны). Кроме того, в дифференцирующихся культурах наблюдались структуры, напоминающие сосуды. Эффективную дифференцировку ЭС клеток человека в нейрональном направлении разработали Джерард и соавт. [82]. Метод был основан на блокировании сигнализации, осуществляемой в клетках BMP, с помощью его антагониста noggin на ранних стадиях дифференцировки. Такой подход при длительном культивировании позволил получить до 90% клеток, которые экспрессировали маркеры предшественников нейронов, такие как нестин и PSA-NCAM (молекула адгезии нервных клеток). Дальнейшее культивирование приводило к появлению зрелых нервных клеток, экспрессирующих MAP2 и бета-III-тубулин. Важно отметить, что в разработанных авторами условиях культивирования в течение длительного времени не происходило появления глиальных клеток. Только через 80 дней культивирования отмечалось появление GFAP-положительных клеток.

Использование данного метода приводило к преимущественной дифференцировке клеток в ГАМК-ергические нейроны. Было отмечено лишь незначительное количество ТГ(тирозингидроксилаза)-положительных клеток (предположительно дофаминергических нейронов) и полное отсутствие глутаматергических нейронов. Однако, если на определенной стадии дифференцировки (около 40 дней культивирования) клетки обрабатывали рядом ростовых факторов, таких как FGF8 (фактор роста фибробластов), GDNF (нейротрофический фактор глии), BDNF (нейротрофический фактор мозга) и аскорбиновая кислота в разных сочетаниях, то количество ТГ-положительных клеток существенно возрастало. Авторы делают вывод о возможности получения обогащенных нейрональных популяций путем использования различных сочетаний ростовых факторов.

Модифицированный лецитином BDNF также усиливал нейрональную дифференцировку ЭС клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [83].

Дифференцировка клеток в нейрональном направлении сопровождается внутриклеточной активацией ERK 1/2 (протеинкиназы, регулируемые внеклеточными сигналами) [84]. Соответствующее подавление активности этих киназ с помощью специфических ингибиторов (U0126) приводило к существенному замедлению нейрональной дифференцировки. Кроме того, данный ингибитор вызывал активацию каспазы-3, что свидетельствовало о том, что сигнальный путь передачи информации, связанный с ERK, принимает участие не только в процессе дифференцировки, но и в поддержании жизнеспособности клеток.

Изучение дифференцировки по нейрональному пути в ЭС клетках, лишенных JNK1, JNK2 и JNK3 протеинкиназ, (относящихся к семейству стресс-активируемых протеинкиназ) выявило любопытные закономерности [85]. ЭС клетки, лишенные JNK2 и JNK3 киназ, так же как и нормальные клетки, обладали нормальной способностью дифференцироваться в нейрональном направлении, тогда как у ЭС клеток, лишенных JNK1, такая способность отсутствовала. В то же время в таких клетках наблюдалась преимущественно эпителиальная дифференцировка. Оказалось, что нейрональную дифференцировку в ЭС клетках млекопитающих можно индуцировать и факторами, которые синтезируются нейронами птиц. Добавление кондиционированной среды от культур корешковых нейронов дорзальных ганглиев цыпленка приводило к существенной стимуляции такой дифференцировки [86].

#### *Пептидные регуляторы нейроглиальной дифференцировки*

В отличие от факторов роста и дифференцировки, которые представляют собой достаточно большие белковые молекулы, вследствие чего стоимость их очень велика, регуляторные пептиды потенциально являются более привлекательными и перспективными факторами, влияющими на процессы направленной дифференцировки ЭС клеток.

Казиллис с соавт. [87] использовали для дифференцировки ЭС клеток мыши два регуляторных пептида: полипептид, активирующий аденилатциклазу из гипофиза (PACAP), и вазоактивный интестинальный полипептид (VIP). Оба пептида осуществляют свое действие через VPAC1 и VPAC2 рецепторы, ассоциированные с GTP-связывающими белками. Инкубация ЭС клеток с каждым из этих пептидов в конечной концентрации 100 нМ в течение 8 дней со времени посева и последующего формирования ими эмбрионных тел приводила к индукции направленной дифференцировки клеток в нейрональном направлении. Если в контрольных культурах доля клеток с нейро-

нальным фенотипом (положительных по окраске на нейрон-специфическую енолазу) составляла от 10 до 25%, то после обработки RASAP и VIP она возрастала до 80 и 91%, соответственно. В то же время RASAP и VIP не изменяли количество O4-положительных клеток (маркер на олигодендроциты). В обработанных этими пептидами культурах не обнаружено и GFAP-положительных клеток (маркер астроцитов). В дифференцированных культурах процент TГ-положительных клеток и ГАМК-положительных клеток составлял 47 и 52% в случае индукции дифференцировки RASAP и 54 и 42% в случае обработки клеток VIP, соответственно. Оба пептида стимулировали образование нейритов и увеличивали их длину в обработанных культурах. И эти пептиды не являются исключением. Так, Ким с сотр. [88] показали, что агонисты мю- и каппа-опиоидных рецепторов также оказывающих воздействие на клетку через систему GTP-связывающих белков, стимулируют дифференцировку ЭС клеток в нейрональные предшественники. Предполагается, что их действие осуществляется через систему соответствующих протеинкиназ, а именно ERK. Таким образом, использование коротких пептидов может в будущем оказаться перспективным подходом к направленной дифференцировке как ЭС, так и других стволовых клеток, с последующим использованием их в клеточной терапии.

#### *Гемопоэтический путь дифференцировки*

Гемопоэз – это образование форменных элементов крови из стволовых клеток. Стволовые клетки костного мозга дают начало двум путям развития: лимфоидному (В- и Т-лимфоциты) и миелоидному (эритроциты, макрофаги, сегментоядерные клетки и мегакариоциты). При развитии эмбриона гемопоэз идет по двум независимым путям: первичному и вторичному. В первичном гемопоэзе, необходимом только для эмбрионального развития, участвуют клетки желточного мешка, которые продуцируют эмбриональные эритроциты и макрофаги, но которые не способны образовать гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и клетки лимфоидного ряда. В ходе вторичного гемопоэза образуются ГСК и затем все типы клеток крови, имеющиеся во взрослом организме.

При культивировании в среде с эмбриональной сывороткой ЭС клетки подвергаются дифференцировке преимущественно по гемопоэтическому пути с высокой воспроизводимостью экспериментов [89]. В образующихся эмбриоидных телах более 50% клеток экспрессируют рецептор Flk-1 (рецептор для VEGF), маркер, характерный для гемопоэтических клеток и клеток кровеносных сосудов



[90], и более 5% способны дать стабильно размножающуюся линию гемопоэтических клеток. Детальное исследование кинетики дифференцировки, набора работающих генов, уровня их экспрессии и сравнение с данными по клеткам желточного мешка показало, что ЭС клетки развиваются по пути первичного гемопоэза [91–93].

Чтобы направить ЭС клетки по пути вторичного гемопоэза, нужно изменить условия выращивания клеток. При совместном культивировании ЭС клеток со стромальными клетками линии OP9 они дифференцируются в В-лимфоциты под действием лимфоидных цитокинов [94, 95].

Клетки со свойствами ГСК были получены при выращивании ЭС клеток на среде, содержащей также IL-3, IL-6 и SCF (stem cell factor). Клетки, имеющие маркеры CD45 и c-kit, были отобраны и введены в бедренную кость мышам, у которых клетки костного мозга были убиты путем облучения. Через некоторое время в крови мышей были обнаружены клетки лимфоидного и миелоидного рядов, образовавшиеся из соответствующих ЭС клеток [96]. Также было показано, что повышенная экспрессия гена *NoxB4* приводит к образованию ГСК, способных функционировать *in vivo* [97]. ЭС клетки представляют собой удобную модель для изучения ранних стадий гемопоэтического пути, так как в составе эмбриона эта система труднодоступна для изучения.

#### *Дифференцировка ЭС клеток в инсулин-продуцирующие клетки*

В настоящее время диабет встречается у 4–5% человеческой популяции и к 2010 году общее количество больных в мире может превысить 350 млн. Разработка подходов к направленной дифференцировке ЭС клеток в бета-клетки островков Лангерганса и последующая трансплантация таких клеток чрезвычайно важны для развития новых методов лечения этого тяжелого заболевания. Ассади с соавт. [98], используя ЭС клетки человека (линия H9), показали, что длительное культивирование этих клеток, сопровождающееся образованием эмбрионидных тел, приводит к появлению достаточно большого количества клеток, продуцирующих инсулин. До 60% эмбрионидных тел после 19 дней дифференцировки давали положительную иммуноцитохимическую окраску на инсулин. Первые клетки, синтезирующие инсулин, появлялись уже на 14-й день культивирования. В эмбрионидных телах, дающих положительную окраску на инсулин, примерно 1–3% клеток имели высокий уровень синтеза инсулина. Однако авторам не удалось выявить индукцию секреции инсулина под действием глюкозы. Лумельски с соавт. [99]

разработали 5-стадийный метод дифференцировки ЭС клеток в инсулин-продуцирующие. В дальнейшем Ши с соавт. [100] удалось усовершенствовать процедуру дифференцировки ЭС клеток и сократить время получения бета-клеток до двух недель. Основным подход, использованный авторами, заключался в последовательной обработке ЭС клеток мыши (линия R1) различными факторами роста: активином А, ретиноевой кислотой и bFGF. Важным достижением авторов явилось получение клеток, у которых секреция инсулина регулировалась добавлением глюкозы. Полученные клетки экспрессировали специфические маркеры, присутствующие на бета-клетках островков Лангерганса. Введение таких клеток мышам с экспериментальным диабетом нормализовало уровень глюкозы в крови. Однако, как и в ряде других случаев, трансплантация таких инсулин-продуцирующих клеток, довольно часто приводила к развитию у животных злокачественных опухолей.

#### *Дифференцировка ЭС клеток в другие типы клеток*

Использование сочетаний различных факторов позволяет получать преимущественную дифференцировку ЭС клеток и в другие клеточные типы. Так, фактор роста гепатоцитов (HGF) совместно с NGF существенно сдвигали направление дифференцировки ЭС клеток мыши в сторону образования гепатоцитов: через 15 дней культивирования в присутствии этих факторов наблюдалось появление большого количества функционально активных гепатоцитов. Это было подтверждено детекцией экспрессии в них специфических маркеров, таких как альфа1-антитрипсин, альфа-фетопропротеин, альбумин и ядерный фактор печеночных клеток [101]. Ингибирование TGF- $\beta$  (трансформирующий ростовой фактор-бета) и связанного с ним пути сигнализации в ЭС клетках приводило к ингибированию дифференцировки по пути образования гладкомышечных клеток.

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ ЭС КЛЕТОК ДЛЯ ИХ НАПРАВЛЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Введение определенных генов в ЭС клетки различного происхождения позволяет не только исследовать функции этих генов, но и подойти к решению проблемы индукции направленной дифференцировки и получению в итоге достаточно больших количеств клеток определенного фенотипа, пригодных для клеточной терапии. Некоторые примеры использования генетических модификаций ЭС клеток суммированы в табл. 2.

Ким с соавт. [103] для получения дофаминергических нейронов использовали генетическую модификацию ЭС клеток транскрип-

Таблица 2.  
**Примеры использования генетически модифицированных ЭС клеток для клеточной терапии**

Заболевание	Гены, трансфицированные в ЭС клетки	Источник литературы
Аутоиммунный энцефалит	<i>MOG</i> и <i>TRAIL</i>	[102]
Болезнь Паркинсона	<i>nurr1</i>	[103]
Болезнь Паркинсона	<i>bcl-XL</i>	[104]
Диабет	<i>nkx2.2</i>	[107]
Патологии ретины	<i>rx/rax</i>	[108]
Инсульт	<i>bcl-2</i>	[105]
Инсульт	<i>NO synthase</i>	[75]
Патологии гемопоэза	<i>SDF-1</i>	[109]
Патологии мышц	<i>IGF-II</i>	[106]
Метахроматическая лейкодистрофия	арилсульфатаза	[110]
Серповидноклеточная анемия	бета(A)-глобин	[111]

ционным фактором *Nurr1* с последующей дифференцировкой клеток в присутствии линии стромальных клеток РА6. В линиях клеток с суперэкспрессией *Nurr1* образовывалось в 2 раза больше нейронов по сравнению с контрольными культурами. Кроме того, количество ТГ-положительных клеток в культурах превышало 50% от общего количества. Полученные ТГ-положительные клетки не только синтезировали и секретировали дофамин в среду, но и обладали сходными электрофизиологическими характеристиками с дофаминергическими нейронами среднего мозга. Трансплантация таких клеток в стриатум мыши приводила к их эффективной интеграции в ткань мозга.

Другой подход был реализован в работе Шим с соавт. [104]. Авторами были получены линии ЭС клеток, трансфицированные геном *bcl-xl*, которые экспрессировали антиапоптотический белок, относящийся к семейству *Bcl-2*. Дифференцировка трансфицированных клеток приводила к появлению большего количества клеток, экспрессирующих маркеры дофаминергических нейронов, по сравнению с контрольными клетками. Более того, такие клетки были менее чувствительны к цитотоксическому действию 1-метил-1-4-фенилпиридина, известного специфического цитотоксического агента для дофаминергических нейронов. После пересадки клеток, экспресси-

рующих ген *bcl-xl*, в мозг крыс с симптомами болезни Паркинсона наблюдалось более отчетливое восстановление нормальных поведенческих симптомов по сравнению с животными, которым были пересажены контрольные клетки.

Вей с соавт. [105] использовали ЭС клетки мыши, также трансфицированные геном *bcl-2*, для попытки коррекции нарушений в мозге после экспериментального инсульта. Обработка трансфицированных клеток ретиноевой кислотой для индукции нейрональной дифференцировки и последующая пересадка их в полость, образованную после инсульта, через 1–8 недель после пересадки приводила к заполнению этой полости клетками, экспрессирующими маркеры нейронов, астроцитов и олигодендроцитов. Более того, пересаженные клетки обладали повышенной жизнеспособностью и способностью к нейрональной дифференцировке, а у животных, которым были пересажены эти клетки, наблюдалось ускоренное восстановление нарушенных функций мозга. Таким образом, генетически модифицированные ЭС клетки в перспективе могут быть ценнейшим лечебным средством в терапии тяжелых инсультов.

С помощью генетических модификаций ЭС клеток можно добиваться их дифференцировки и в другие типы клеток. Канно с соавт. [75] использовали аденовирусный вектор, содержащий индуцибельную форму NO-синтазы для индукции дифференцировки ЭС клеток мыши в кардиомиоциты. Трансфицированные клетки формировали примерно в 4 раза больше кластеров сокращающихся кардиомиоцитов по сравнению с контрольными культурами. К такому же эффекту приводила обработка ЭС клеток на стадии эмбрионидных тел с помощью соединений, генерирующих NO. Образовавшиеся *in vitro* кардиомиоциты экспрессировали антигенные маркеры зрелых кардиомиоцитов, такие как тропонин I и легкие цепи миозина. Интересно отметить, что NO не только индуцировал дифференцировку ЭС клеток в кардиомиоциты, но и стимулировал апоптоз в недифференцированных клетках.

Индукция миогенной дифференцировки была получена после трансфекции ЭС клеток мыши геном IGF-II (инсулиноподобный ростовой фактор-2) [106]. Клетки, после трансфекции и соответствующей селекции, обладали способностью экспрессировать как ранние (миогенин, *myoD*), так и поздние (дистрофин) маркеры скелетной мускулатуры. Трансплантация таких клеток мышам с повреждениями передней большеберцовой мышцы приводила к существенному восстановлению ее двигательных функций по сравнению с контролем. При этом происходило образование новых

миофибрилл. Авторы приходят к выводу о том, что генетические модификации ЭС клеток IGF-II могут быть перспективны при их использовании в клеточной терапии различных типов мышечных болезней и повреждений.

Генетические модификации ЭС клеток с помощью гена *Nkx2.2* приводили к появлению бета-клеток поджелудочной железы *in vitro* [107]. Эти клетки обладали способностью синтезировать и секретировать инсулин в среду, а также экспрессировать некоторые клеточные маркеры бета-клеток (проинсулин 1, проинсулин 2 и PDX1). Однако авторам не удалось продемонстрировать секрецию инсулина под действием глюкозы.

Модификация ЭС клеток транскрипционным фактором *Rx/rax* приводила к дифференцировке части клеток в нейроны сетчатки глаза *in vitro* [108]. Причем, судя по электрофизиологическим данным, дифференцированные клетки обладали функциональной активностью.

Некоторые факторы, продуцируемые стромальными клетками, способны оказывать влияние на дифференцировку ЭС клеток по гематопоезическому пути. Так, трансфекция ЭС клеток мыши фактором стромальных клеток SDF-1/CXCL12 стимулировала образование эритроидных, макрофагальных и мультипотентных предшественников гематопоезических клеток *in vitro* [109].

Хорошо известно тяжелое заболевание метахроматическая лейкодистрофия, характеризующаяся нарушениями в обмене липидов и прогрессирующей демиелинизацией в ЦНС. Основная причина заболевания связана с недостатком фермента – арилсульфатазы (АС). Были получены мыши с дефицитом данного фермента, моделирующие это заболевание. ЭС клетки, трансфицированные геном АС, были использованы для попытки коррекции данного заболевания у соответствующих мышей. После трансфекции клетки дифференцировали в предшественники глиальных клеток и затем пересаживали в мозг АС-дефицитным мышам. Пересаженные клетки сохраняли свою жизнеспособность и интегрировались в различные отделы мозга. Через 4 недели после пересадки было обнаружено существенное (примерно на 50%) уменьшение отложений сульфатидов в отделах мозга опытных животных, что свидетельствовало в пользу успешности проведенной клеточной терапии [110].

Успешное «исправление» распространенного заболевания крови серповидноклеточной анемии было осуществлено Ву с сотр. на модели мышей, экспрессирующих мутантный ген бета(S)-глобина человека [111]. В ЭС клетках, полученных от таких мышей, авторы с помощью

гомологичной рекомбинации провели замену гена бета(S)-глобина на нормальный ген бета(A)-глобина с последующим получением трансгенных животных, у которых полностью отсутствовали признаки патологии. Недавно Хана с сотр. [112] также удалось получить аналогичные результаты, однако с использованием аутологичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с исправленным с помощью метода гомологичной рекомбинации геном бета-глобина человека.

Модификации ЭС клеток различными вирусными генами представляют интерес не только с точки зрения изучения функций таких генов и их влияния на ранние стадии эмбрионального развития и клеточной дифференцировки, но и с точки зрения создания клеточных моделей для фармакологических исследований.

В ходе исследований функций различных генов вируса иммунодефицита человека были получены линии ЭС клеток мыши, трансфицированные регуляторными генами *tat* и *nef* этого вируса [113]. Ранее было показано, что ген *tat*, обладая онкогенным потенциалом, активирует транскрипцию некоторых клеточных генов и усиливает пролиферацию клеток. Ген *nef*, подавляет экспрессию отдельных клеточных генов и снижает рост клеток, вместе с тем он кооперирует с геном *tat* при образовании фокусов трансформации [114]. Трансфекция этими генами ЭС клеток мыши выявила ряд интересных фактов [115]. Выяснилось, что клетки, трансфицированные геном *tat*, обладали более высокой пролиферативной активностью по сравнению как с контрольными, так и с клетками, трансфицированными геном *nef*. Хотя время, необходимое для образования эмбрионных тел всеми линиями трансфицированных клеток, практически не отличалось от контрольных клеток. В культурах, трансфицированных геном *nef*, количество образующихся эмбрионных тел примерно в 2 раза выше, а с геном *tat* – примерно в 2 раза ниже, чем в контроле. Процент эмбрионных тел с сокращающимися кардиомиоцитами был примерно в 1.5 раза выше по сравнению с контрольными у клеток, трансфицированных геном *nef*, и ниже в ЭС клетках с геном *tat*. Таким образом, наблюдалась обратная корреляция между эффектами регуляторных генов ВИЧ на пролиферацию ЭС клеток, с одной стороны, и на их дифференцировку, с другой [115].

Генетические модификации ЭС клеток позволяют влиять на самые ранние этапы их дифференцировки. Было изучено влияние гена *pub*, являющегося специфическим ингибитором транскрипционного фактора PU.1, который в свою очередь принимает участие в регуляции гематопозеза, на пролиферацию и начальные стадии дифференци-



ровки ЭС клеток мыши *in vitro*. Для этой цели были использованы два подхода: повышенная экспрессия гена *pub* человека (*hpub*) и подавление экспрессии эндогенного гена *pub* мыши с помощью РНК интерференции [116, 117]. Генетически модифицированные поликлональные линии ЭС клеток, трансфицированные плазмидами с экспрессирующимся геном *hpub* или плазмидами, генерирующими малые интерференционные РНК (миРНК) для этого гена под контролем цитомегаловирусного промотора, не изменяли свою пролиферативную активность по сравнению с контрольными клетками. Подавление экспрессии эндогенного гена *pub* с помощью миРНК в ЭС клетках приводило к двукратному уменьшению образования эмбрионидных тел, тогда как дополнительная экспрессия экзогенного гена *hpub* увеличивала их количество также примерно в 2 раза по сравнению с контролем. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 11.

Полученные результаты позволяют предполагать, что ген *pub* принимает важное участие уже на самых начальных этапах дифференцировки ЭС клеток, приводящих к образованию эмбрионидных тел.

В дальнейшем проводилась оценка влияния повышенной и пониженной экспрессии этого гена на спонтанную дифференцировку трансфицированных клеток *in vitro* в кардиомиоциты (рис. 12) и в нейроны (рис. 13).

Результаты, представленные на рис. 12, свидетельствуют о стимуляции образования кластеров сокращающихся кардиомиоцитов в культурах клеток с суперэкспрессией гена *hpub* (примерно в 2 раза по сравнению с контролем) и уменьшении их количества в 3–4 раза в культурах с пониженной экспрессией гена *pub*. Интересно отметить, что в условиях нейрональной дифференцировки повышение и понижение экспрессии данного гена приводило к совершенно другой картине. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 13.

Оказалось, что суперэкспрессия гена *hpub* приводила к существенному (в 2 раза) понижению количества нейронов в культурах через 20 дней после посева клеток (рис. 13 А). В то же время понижение экспрессии гена *pub* с помощью РНК интерференции, напротив, примерно в 2,5 раза повышало количество нервных клеток (рис. 13 Б). Таким образом, изменение экспрессии гена *pub* в ЭС клетках оказывает разнонаправленное влияние на их дифференцировку в кардиомиоциты (производные мезодермы) и нейроны (производные эктодермы).

Использование малых интерферирующих РНК (миРНК) для изучения функций генов в ЭС клетках и при их дифференцировке в

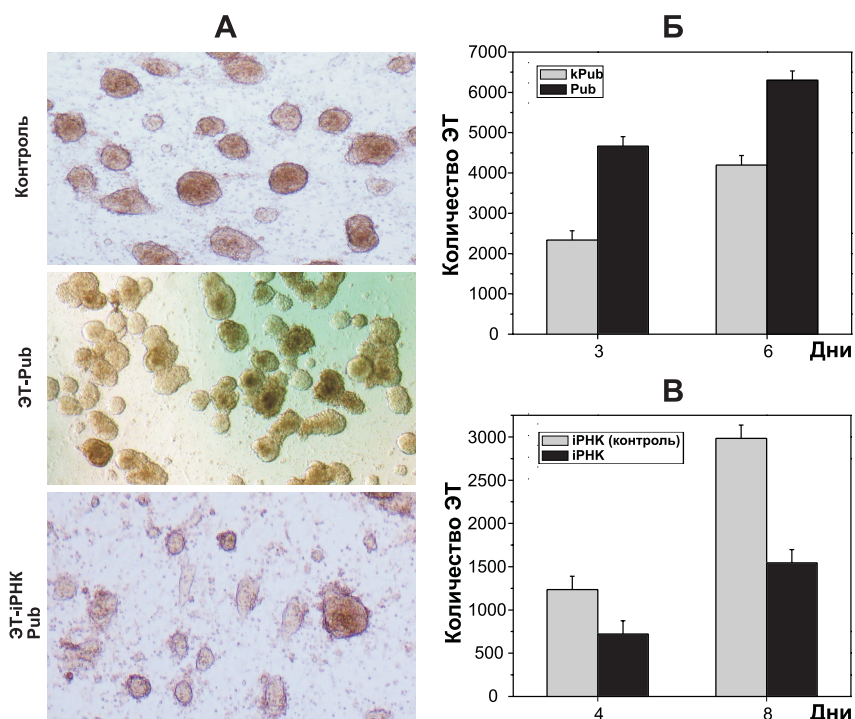


Рис. 11. Влияние повышенной экспрессии гена *hpub* и пониженной экспрессии гена *rub* на образование эмбрионидных тел ЭС клетками мыши.

А. Фотографии эмбрионидных тел в культуре через 3–4 дня после посева клеток (x200).

Контроль. Линия клеток ЭС-ДНК3. Клетки были трансфицированы контрольным вектором, не несущим ген *hPub*. Аналогичная картина наблюдалась в случае контрольной линии ЭС-Ineo.

ЭТ-*hPub*. Линия клеток ЭС-Pub. Клетки были трансфицированы вектором несущим ген *hPub*.

ЭТ-iRNK Pub. Линия клеток ЭС-iRNK. Клетки были трансфицированы вектором, несущим последовательность, генерирующую интерферирующую РНК для гена *Pub*.

Б. Гистограмма количества эмбрионидных тел в трансфицированных культурах ЭС клеток через 3 и 6 дней культивирования.

Серые столбики – *kPub* (контрольная линия ЭС-ДНК3). Черные столбики – *Pub* (линия ЭС-Pub).

В. Гистограмма количества эмбрионидных тел в трансфицированных культурах ЭС клеток через 4 и 8 дней культивирования.

Серые столбики – *iRNK* (контроль) (контрольная линия ЭС- Ineo). Черные столбики – *iRNK* (линия ЭС-iRNK). По оси ординат – число эмбрионидных тел. По оси абсцисс – время культивирования (дни). \* $p < 0.05$ .

Культуры клеток	Количество сокращающихся кластеров кардиомиоцитов (на лунку)
ЭС-ДНК3 (контроль)	8±2
ЭС-hpub	16±2,5
ЭС-lneo (контроль)	5±1
ЭС-iРНК	1,5±0,5

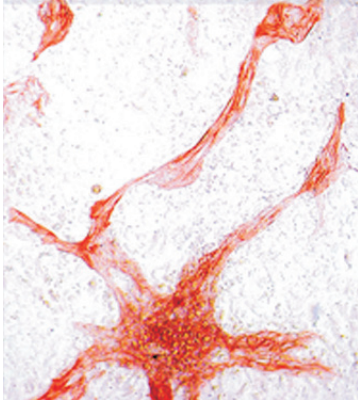


Рис. 12. Влияние повышенной экспрессии гена *hpub* и пониженной экспрессии гена *pub* на дифференцировку ЭС клеток мыши в кардиомиоциты.

В таблице приведены статистические данные по влиянию повышенной экспрессии (линия ЭС-hpub) и пониженной экспрессии (линия ЭС-iРНК) на формирование кластеров сокращающихся кардиомиоцитов. Контрольные линии клеток: ЭС-lneo и ЭС-ДНК3. Справа на микрофотографии иммуноцитохимическое окрашивание кластеров кардиомиоцитов антителами к тропонину I (x200).

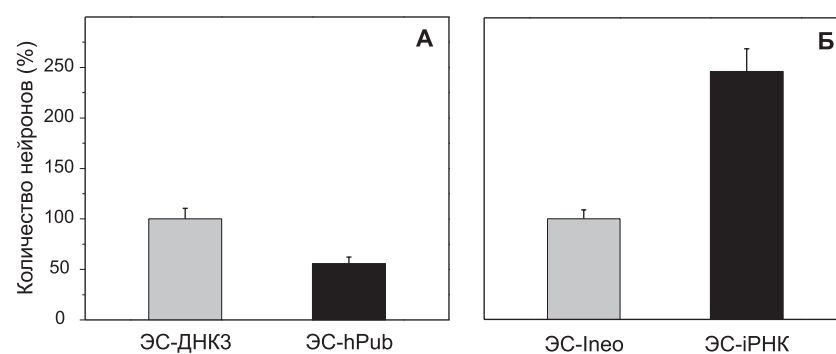


Рис. 13. Влияние повышенной экспрессии гена *hpub* (А) и пониженной экспрессии гена *pub* (Б) на процессы нейрональной дифференцировки ЭС клеток *in vitro*.

Гистограмма количества нейронов в трансфицированных культурах ЭС клеток на 20-е сутки после посева.

А. По оси ординат – количество нейронов на лунку в процентах (n = 10). Серый столбик – линия клеток ЭС-ДНК3 (контроль), черный столбик – линия клеток ЭС-hPub. \*p < 0.05.

Б. По оси ординат – количество нейронов на лунку (n = 10). Серый столбик – линия клеток ЭС-lneo, черный столбик – линия клеток ЭС-iРНК. \*p < 0.05.

клетки различных типов получило в последнее время широкое распространение [118–120]. Так, трансфекция ЭС клеток мыши миРНК для генов *Oct-4* и *Sox-2* приводила к существенному замедлению их нейрональной дифференцировки [121]. Если в контрольных ЭС клетках количество колоний, выявляемых с помощью антител к нейрон-специфическому бета-III-тубулину, составляло около 90%, то при подавлении экспрессии гена *Sox-2* – около 65%, а гена *Oct-4* – всего 45%. На моделях ЭС клеток и клеток эмбриональной карциномы человека было показано, что подавление экспрессии генов *Oct-4* и *Sox-2* с помощью РНК интерференции приводило к индукции мезодермальной дифференцировки [122].

Оказалось, что для поддержания клеток этих двух видов в недифференцированном состоянии принципиально важным является нормальное функционирование системы FGF–FGFR.

В то же время, подавление экспрессии *Oct-3/4* в ЭС клетках мыши с помощью миРНК или антисмысловых последовательностей приводило к ингибированию их мезодермальной, а впоследствии – и кардиомиоцитарной дифференцировки [123].

Подавление экспрессии гена *L3/Lhx8* в ЭС клетках мыши выявило его специфическую роль в процессах нейрональной дифференцировки [124]. Трансфекция ЭС клеток вектором, содержащим последовательности, генерирующие миРНК для гена *L3/Lhx8* под контролем *H1.2* промотора, приводила в условиях их направленной дифференцировки в клетки нервной системы под действием ретиноевой кислоты к практически полному ингибированию образования холинергических нейронов, выявляемых по окраске на холинацетилтрансферазу. В то же время, в таких культурах не было обнаружено заметных изменений в количестве образовавшихся ГАМК-ергических нейронов. Индукция экспрессии гена *L3/Lhx8* восстанавливала образование холинергических нейронов. Авторы пришли к выводу, что этот ген играет ключевую роль в дифференцировке ЭС клеток в холинергические нейроны и вовлечен в развитие базальных ядер переднего мозга.

Разнонаправленное влияние на экспрессию генов, заключающееся либо в подавлении, либо в стимуляции их экспрессии, позволяет выявлять вовлеченность их продуктов в регуляцию процессов клеточной пролиферации, жизнеспособности и дифференцировки. Так, стимуляция экспрессии хорошо известного антиапоптотического гена *Bcl2* в ЭС клетках мыши, приводила к увеличению образования гематопозитических эмбрионидных тел с их последующей дифференцировкой в гематопозитические колонии при их посеве в метилцеллюлозе [125]. В то же время у ЭС клеток, трансфицированных плазмидой, генерирую-

щей последовательности миРНК для этого гена, существенно понижалась способность к дифференцировке по гематопоэтическому пути.

Известно, что в ходе эмбриогенеза млекопитающих эмбрионы, особенно на ранних стадиях, развиваются в условиях ограниченного доступа кислорода. Было показано, что фактор, индуцированный гипоксией (HIF-1), способен ингибировать путь передачи сигнала через систему LIF-STAT3 в ЭС клетках мыши, непосредственно ингибируя экспрессию LIFR, путем связывания с регуляторным элементом, присутствующим в промоторе этого гена [126]. Суперэкспрессия HIF-1, а также подавление его экспрессии с помощью РНК интерференции подтвердили этот эффект на экспрессию LIFR. Таким образом, HIF-1 способен стимулировать дифференцировку ЭС клеток путем ингибирования LIF-STAT3 системы передачи сигнала, ответственной за поддержание плюрипотентности ЭС клеток.

Заслуживает внимания разработка генетических векторов, несущих интерферирующие последовательности РНК, экспрессия которых может регулироваться различными факторами. Так, Ванг с соавт. использовали регулируемую тетрациклином плазмиду, генерирующую миРНК, которая была стабильно интегрирована в ЭС клетки мыши [127]. С использованием этой модели авторы продемонстрировали индуцибельную и обратимую репрессию гена *Npm1* в этих клетках при действии специфических миРНК, которая, в свою очередь, приводила к подавлению пролиферации ЭС клеток.

Возможность подавления экспрессии определенных генов, особенно ключевых для того или иного типа клеточной дифференцировки, открывает перспективы получения больших количеств «гомогенных» клеточных популяций с определенным типом дифференцировки, что крайне необходимо для их использования в клеточной терапии.

Для индукции дифференцировки ЭС клеток по нейрональному пути представляется эффективным использование генов нейротрофинов, трофических факторов, оказывающих влияние на пролиферацию, дифференцировку клеток в нейроны определенной ергичности и на их жизнеспособность, о чем упоминалось ранее [34]. Результаты по индукции нейрональной дифференцировки в ЭС клетках с помощью суперэкспрессии гена *ngf*, кодирующего фактор роста нервов, представлены на рис. 14. ЭС клетки мыши были трансфицированы плазмидой, содержащей ген *ngf* слитый с геном GFP, под контролем цитомегаловирусного промотора.

Хорошо видны длинные отростки формирующихся нейронов и ассоциаты этих клеток, по морфологии напоминающие нервные узлы. Иммуноцитохимическая детекция клеток была осуществлена через 24

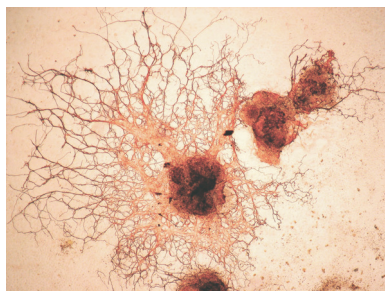


Рис. 14. Иммуноцитохимическое окрашивание ЭС клеток линии NGF-GFP антителами к бета-III-тубулину (24 дня культивирования), (x200).

дня их культивирования *in vitro*. В контрольных культурах подобные структуры не обнаруживались.

Таким образом, различные подходы к генетической модификации ЭС клеток, включающие как подавление экспрессии отдельных генов, так и их суперэкспрессию, являются перспективным направлением исследований дифференцировки этих клеток.

Однако использование генетически модифицированных ЭС клеток, с определенным направлением

клеточной дифференцировки, в клеточной терапии тяжелых заболеваний человека в настоящее время ограничено из-за недостаточной проработки отдаленных эффектов таких модификаций на организм пациента, в частности риска развития опухолевых новообразований.

#### IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение ЭС клеток и разработку методов манипулирования с ними, безусловно, следует отнести к одному из самых замечательных и важных достижений науки на рубеже третьего тысячелетия. Поскольку, ЭС клетки млекопитающих представляют собой практически неисчерпаемый источник недифференцированных и нетрансформированных клеток с нормальным диплоидным кариотипом, они будут оставаться важнейшим объектом для исследователей, занимающихся изучением путей эмбрионального развития, формирования и функционирования отдельных типов тканей в норме и при различных патологиях. Кроме того, ЭС клетки человека, и в частности генетически модифицированные, в перспективе, безусловно, найдут применение в клеточной терапии тяжелых заболеваний человека.

Однако результаты последних исследований открывают совершенно новые возможности в области клеточной терапии. Речь идет о возможности репрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентные стволовые клетки с дальнейшей их дифференцировкой в клетки различных типов и последующей трансплантацией таких клеток пациентам, страдающим различными неизлечимыми заболеваниями.



В 2006 г. японским исследователям Такахаши и Яманаке [128] удалось осуществить репрограммирование взрослых и эмбриональных фибробластов мыши в плюрипотентные стволовые клетки. Авторы назвали эти клетки – индуцированные плюрипотентные стволовые (iPS) клетки. На предварительных стадиях работы был осуществлен отбор 24 генов-кандидатов, которые могли бы участвовать в индукции плюрипотентности в соматических клетках и поддержании таковой в ЕС клетках. Репrogramмирование фибробластов было осуществлено *in vitro* путем введения в эти клетки, с помощью ретровирусных векторов, четырех транскрипционных факторов Oct3/4, Sox2, с-Мус и Klf4. Полученные в результате такой обработки iPS клетки обладали сходной с ЭС клетками морфологией, ростовыми свойствами и экспрессировали специфические маркеры, присущие ЕС клеткам. Трансплантация таких клеток иммунодефицитным мышам приводила к образованию опухолей, в которых присутствовали клетки различных тканей, производных всех трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы). Однако при введении iPS клеток в бластоцисты мышей не удалось обнаружить среди родившегося потомства (27 особей) химерных животных. Таким образом, была продемонстрирована возможность получения плюрипотентных клеток млекопитающих *in vitro* путем обработки их ограниченным количеством определенных регуляторных факторов. Позднее, в 2007 г. сотрудникам этой лаборатории все-таки удалось получить химерных животных с использованием iPS клеток [129,130].

В самом начале 2008 г. Аои с сотр. [131] получили клоны iPS клеток из клеток печени и слизистой желудка взрослых мышей. В конце 2007 начале 2008 г. Такахаши с сотр. [132] и Накагава с сотр. [133] из той же лаборатории Киотского университета сообщили об успешной дедифференцировке фибробластов взрослого человека и получении iPS клеток с помощью тех же факторов (Oct3/4, Sox2, с-Мус и Klf4). Примерно в то же время об успешном получении iPS клеток человека из фибробластов, опять же с использованием указанных выше факторов, сообщила и группа американских ученых [134]. Следует отметить, что полученные iPS клетки напоминали ЭС клетки человека по ряду признаков: морфологии, пролиферативной активности, экспрессии поверхностных антигенов, глобальной экспрессии генов, эпигенетическому статусу генов, ответственных за плюрипотентность, активности теломеразы, и, что особенно важно, имели нормальный диплоидный набор хромосом. Кроме этого полученные клеточные линии обладали способностью к дифференцировке в различные виды клеток всех трех зародышевых листков как *in vitro*, так в тератомах.

Однако Накагава с сотр. [133] удалось существенно улучшить методику получения iPS клеток и исключить использование ретровирусного вектора, содержащего ген *Myc*, из протокола экспериментов. По данным этих авторов, такой подход существенно снижал уровень риска развития опухолей у химерных животных.

Юи с сотр. [135] получили iPS клетки из фибробластов человека с использованием несколько другого сочетания факторов. Авторы использовали следующий набор факторов: Oct4, Sox2, NANOG и LIN28. Отсутствие Oct4 или Sox2 полностью предотвращало образование колоний iPS клеток, а отсутствие NANOG или LIN28 уменьшало их количество более чем в 10 раз. В итоге, полученные клоны iPS клеток, так же как и в вышеприведенных примерах, имели нормальный диплоидный набор хромосом и не имели существенных отличий от ЭС человека по морфологии, пролиферативной и теломерной активности, экспрессии поверхностных антигенов, а также способности дифференцироваться в производные трех зародышевых листков.

Возможности получения iPS клеток и их дальнейшее использование для клеточной терапии различных болезней человека представлены на рис. 15. Следует отметить, что дедифференцировке могут подвергаться не только фибробласты кожи, но и другие доступные в существенных количествах клетки, способные к пролиферации. Чрезвычайно важным моментом является возможность получения клеток от пациентов с врожденными заболеваниями, их последующая дедифференцировка в iPS клетки и исправление генетических дефектов в таких клетках с помощью гомологичной рекомбинации и последующая трансплантация клеток тому же пациенту.

Однако потребуются дополнительные интенсивные исследования для минимизации потенциальных мутагенных эффектов при использовании ретровирусных конструкций в процессах дедифференцировки соматических клеток человека.

Эффективность применимости различных подходов, таких как ЭС клетки, iPS клетки и клетки, полученные после переноса ядер, для клеточной терапии остается в настоящее время не достаточно ясной. Потребуется дальнейшие исследования для выявления преимуществ использования одного из указанных выше подходов.

Автор выражает признательность сотрудникам Лаборатории молекулярной генетики соматических клеток Института молекулярной генетики РАН: Е.С.Мануйловой, Е.Л.Арсеньевой и Е.В.Новосадовой за предоставленные результаты и помощь в подготовке данного обзора.

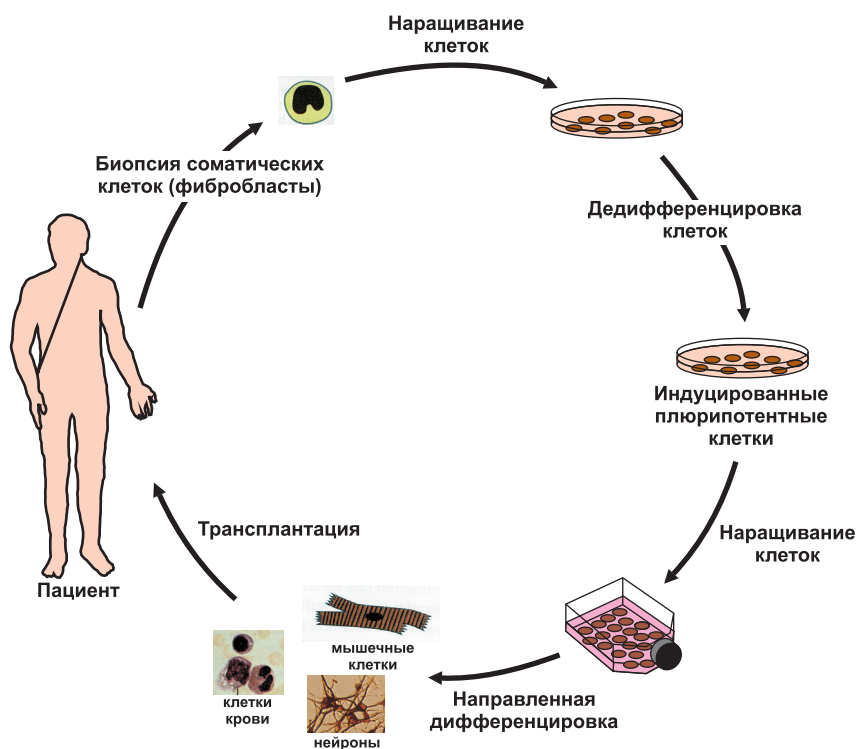


Рис. 15. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток человека для их дальнейшей трансплантации пациенту.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Evans, M.J., Kaufman, M.H. (1981) *Nature*, **292**, 154–156.
2. Martin, G.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 7634–7638.
3. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., Robertson, E. (1984) *Nature*, **309**, 255–256.
4. Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987) *Cell*, **51**, 503–512.
5. Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R. J. (1985) *Embryol. Exp. Morphol.*, **87**, 27–45.
6. Keller, G. (2005) *Genes. Dev.*, **19**, 1129–1155.
7. Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K., Daley, G.Q. (2004) *Nature*, **427**, 106–107.
8. Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., Boiani, M., Scholer, H.R. (2003) *Science*, **300**, 1251–1256.
9. Nayernia, K., Notle, J., Michelmann, H.W., Lee, J.H., Rathack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.F., Elliot, D.J., Okpanyi, V., Zechner, U., Haaf, T., Meinhardt, A., Engel, W. (2006) *Developmental Cell*, **11**, 125–132.

10. *Martin, G.R., Evans, M.J.* (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1441–1445.
11. *Resnick, J.L., Bixler, L.S., Cheng, L., Donovan, P.J.* (1992) *Nature*, **359**, 550–551.
12. *Stewart, C.L., Gadi, I., Bhatt, H.* (1994) *Dev. Biol.*, **161**, 626–628.
13. *Joyner, A.L.* (1993) IRL PRESS at Oxford University Press, p. 109.
14. *Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M.* (1986) *Nature*, **323**, 445–448.
15. *Муталипов Ш.М., Муталипова М.М., Иванов В. И.* (1994) *Онтогенез*, **25**, 19–27.
16. *Savatier, P., Lapillone, H., van Grunsven, L.A., Rudkin, B.B., Samarut, J.* (1996) *Oncogene*, **12**, 309–322.
17. *Rathjen, P., Nichols, J., Toth, S. Edwards, D.R., Heath, J.K., Smith, A.G.* (1990) *Genes Dev.*, **4**, 2308–2318.
18. *Zhang, J.G., Owerzarek, C.M., Ward, L.D., Howlett, G.J., Fanri, L.J., Roberts, B.A., Nicola, N.A.* (1997) *Biochem. J.*, **325**, 693–700.
19. *Burdon, T., Chambers, I., Stracey, C., Niwa, H., Smith, A.* (1999) *Cells Tissues Organs*, **165**, 131–143.
20. *Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., Smith, A.* (1998) *Genes Dev.*, **12**, 2048–2060.
21. *Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., Smith, A.* (2003) *Cell*, **115**, 281–292.
22. *Burdon, T., Smith, A., Savatier, P.* (2002) *Trends Cell Biol.*, **12**, 432–438.
23. *Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., Brivanlou, A.H.* (2004) *Nat. Med.*, **10**, 55–63.
24. *Solter, D., Knowles, B.B.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5565–5569.
25. *Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M.* (1998) *Science*, **282**, 1145–1147.
26. *Armstrong, L., Lako, M., Lincoln, J., Cairns, P.M., Hole, N.* (2000) *Mech. Dev.*, **97**, 109–116.
27. *Асташкин Е.И., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Гривенников И.А., Тарантул В.З., Грачев С.В.* (2005) *Докл. Акад. Наук*, **401**, 380–382.
28. *Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G.* (2000) *Nat. Genet.*, **24**, 372–376.
29. *Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гривенников И.А., Гуляев Д.В., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д., Хрущев Н.Г.* (2002) *Докл. Акад. Наук*, **386**, 555–558.
30. *Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гривенников И.А., Смирнова Ю.А., Красникова Н.Ю., Зиновьева Р.Д., Хрущев Н.Г.* (2003) *Онтогенез*, **34**, 174–182.
31. *Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S.* (2003) *Cell*, **113**, 631–642.
32. *Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., Smith, A.* (1998) *Cell*, **95**, 379–391.
33. *Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A.* (2003) *Cell*, **113**, 643–655.
34. *Pyle, A.D., Lock, L.F., Donovan, P.J.* (2006) *Nat. Biotech.*, **24**, 344–350.
35. *Wei, H., Juharsz, O., Li, J., Tarasova, Y.S., Boheler, K.R.* (2005) *J. Cell. Mol. Med.*, **9**, 804–817.
36. *Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., Bongso, A.* *Nat. Biotechnol.*, **18**, 399–404.
37. *Крылова Т.А., Зенин В.В., Мусорина Н.С., Баранов В.С., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н., Пинаев Г.П., Полянская Г.Г.* (2003) *Цитология*, **45**, 1172–1178.
38. *Прыжкова М.В., Лагарькова М.А., Лякишева А.В., Ревазова Е.С., Гнушев Н.В., Киселев С.Л.* (2004) *Ин-*

- формационный бюллетень «Клеточные культуры», **19**, 22–25.
39. Mitalipova, M., Calhoun, J., Shin, S., Winger, D., Schulz, T., Noglee, S., Venable, A., Lyons, I., Robins, A., Stice, S. (2003) *Stem Cells*, **21**, 521–526.
40. Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Winkler, M.A., Itskovitz-Eldor, J., Thomson, J.A. (2000) *Dev. Biol.*, **227**, 271–278.
41. Odorico, J.S., Kaufman, D.S., Thomson, J.A. (2001) *Stem Cells*, **19**, 193–204.
42. Cowan, C.A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J.P., Wang, S., Morton, C.C., McMahon, A.P., Powers, D., Melton, D.A. N. (2004) *Engl. J. Med.*, **350**, 1353–1356.
43. Daheron, L., Opitz, S.L., Zaehres, H., Lensch, W.M., Andrews, P.W., Itskovitz-Eldor, J., Daley, G.Q. (2004) *Stem Cells*, **22**, 770–778.
44. Xu, R.H., Chen, X., Li, D.S., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., Thomson, J.A. (2002) *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1261–1264.
45. Hay, D.C., Surtherland, L., Clark, J., Burdon, T. (2004) *Stem Cells*, **22**, 225–235.
46. Zaehres, H., Lensch, M.W., Daneron, L., Stewart, S., Itskovitz-Eldor, J., Daley, G.Q. (2005) *Stem Cells*, **23**, 299–305.
47. Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., Itskovitz-Eldor, J. (2004) *Biol. Reprod.*, **70**, 837–845.
48. Chang, I.K., Jeong, D.K., Hong, Y.H., Park, T.S., Moon, Y.K., Ohno, T., Han, J.Y. (1997) *Cell Biol. Int.*, **21**, 495–499.
49. Doetschman, T., Williams, P., Maeda, N. (1998) *Dev. Biol.*, **127**, 224–227.
50. Schoonjans, L., Albright, G.M., Li, J.L., Collen, D., Moreadith, R.W. (1996) *Mol. Reprod. Dev.*, **45**, 439–443.
51. Brenin, D., Look, J., Bader, M., Hubner, N., Levan, G., Iannaccone, P. (1997) *Transplant. Proc.*, **29**, 1761–1765.
52. Iannaccone, P.M., Taborn, G.U., Garton, R.L., Caplice, M.D., Brenin, D.R. (1994) *Dev. Biol.*, **163**, 288–292.
53. Sukoyan, M.A., Golubitsa, A.N., Zhelezova, A.I., Shilov, A.G., Vatolin, S.Y., Maximovky, L.P., Andreeva, L.E., McWhire, J., Pack, S.D., Bayborodin, S.I., Kerkis, A.Y., Kizilova, H.I., Serov, O.L. (1992) *Mol. Reprod. Dev.*, **33**, 418–431.
54. Wheeler, M.B. (1994) *Reprod. Fertil. Dev.*, **6**, 563–568.
55. Notarianni, E., Galli, C., Laurie, S., Moor, R.M., Evans, M.J. (1991) *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **43**, 255–260.
56. First, N.L., Sims, M.M., Park, S.P., Kent-First, M.J. (1994) *Reprod. Fertil. Dev.*, **6**, 553–562.
57. Stice, S.L., Strelchenko, N.S., Keefer, C.L., Matthews, L. (1996) *Biol. Reprod.*, **54**, 100–110.
58. Mitalipova, M., Beyhan, Z., First, N.L. (2001) *Cloning*, **3**, 59–67.
59. Pau, K.Y., Wolf, D.P. (2004) *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **2**, 41.
60. Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becke, R.A., Hearn, J.P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 7844–7848.
61. Mitalipov, S., Kuo, H.C., Byrne, J., Clepper, L., Meisner, L., Johnson, J., Zeier, R., Wolf, D. (2006) *Stem Cells*, **24**, 2177–2186.
62. Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Hearn, J.P. (1996) *Biol. Reprod.*, **55**, 254–259.
63. Suemori, H., Tada, T., Torii, R., Hosoi, Y., Kobayashi, K., Imahie, H., Kondo, Y., Iritani, A., Nakatsuji, N. (2001) *Dev. Dyn.*, **222**, 273–279.
64. Vrana, K.E., Hipp, J.D., Goss, A.M., McCool, B.A., Riddle, D.R., Walke,

- S.J., Wettstein, P.J., Studer, L.P., Tabar, V., Cunniff, K., Chapman, K., Vilner, L., West, M.D., Grant, K.A., Cibelli, J.B.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 11911–11916.
65. *Hernandez, L., Kozlov, S., Piras, G., Stewart, C.L.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13344–13349.
66. Павлова, Г.В., Мануилова, Е.С., Арсеньева, Е.Л., Гривенников, И.А., Муркин, Е.В., Канайкина, Н.В., Ревущин, А.В., Тарантул, В.З., Корочкин, Л.И. (2005) Клеточные технологии в биологии и медицине, **2**, 99–102.
67. *Schmitt, T.M., de Pooter, R.F., Gronski, M.A., Cho, S.K., Ohashi, P.S., Zuniga-Pflucker, J.C.* (2004) *Nat. Immunol.*, **5**, 410–417.
68. *Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H.H., Hescheler, J., Wobus, A.M.* (1994) *Dev. Biol.*, **164**, 87–101.
69. *Bagutti, C., Wobus, A.M., Fassler, R., Watt, F.M.* (1996) *Dev. Biol.*, **179**, 184–196.
70. *Maltsev, V.A., Wobus, A.M., Rohwedel, J., Bader, M., Hescheler, J.* (1994) *Circ. Res.*, **75**, 233–244.
71. *Wobus, A. M., Kaomei, G., Shan, J., Wellner, M.C., Rohwedel, J., Ji, G., Fleischmann, B., Katus, H.A., Hescheler, J., Franz, W.M.* (1997) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 1525–1539.
72. *Ventura, C., Maioli, M.* (2000) *Circ. Res.*, **87**, 189–194.
73. *Xu, C., Police, S., Rao, N., Carpenter, M.K.* (2002) *Circ. Res.*, **91**, 501–508.
74. *Takahashi, T., Lord, B., Schulze, P.C., Fryer, R.M., Sarang, S.S., Gullans, S.R., Lee, R.T.* (2003) *Circulation*, **107**, 1912–1916.
75. *Kanno, S., Kim, P.K., Sallam, K., Lei, J., Billiar, T.R., Shears, L.L.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 12277–12281.
76. *E, L.L., Zhao, Y.S., Guo, X.M., Wang, C.Y., Jiang, H., Li, J., Duan, C.M., Song, Y.* (2006) *J. Heart Lung Transplant.*, **25**, 664–674.
77. *Coraux, C., Hilmi, C., Rouleau, M., Spadafora, A., Hinnrasky, J., Ortonne, J.P., Dani, C., Aberdam, D.* (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 849–853.
78. *Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.I., Sasai, Y.* (2000) *Neuron*, **28**, 31–40.
79. *Gottlieb, D.I., Huettner, J.E.* (1999) *Cells Tissues Organs*, **165**, 165–172.
80. *Ying, Q.L., Smith, A.G.* (2003) *Meth. Enzymol.*, **365**, 327–341.
81. *Levenberg, S., Burdick, J.A., Kraehenbuehl, T., Langer, R.* (2005) *Tissue Eng.*, **11**, 506–512.
82. *Gerrard, L., Rodgers, L., Cui, W.* (2005) *Stem Cells*, **23**, 1234–1241.
83. *Kitagawa, A., Nakayama, T., Take-naga, M., Matsumoto, K., Tokura, Y., Ohta, Y., Ichinohe, M., Yamaguchi, Y., Suzuki, N., Okano, H., Igarashi, R.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 1051–1057.
84. *Li, Z., Theus, M.H., Wei, L.* (2006) *Dev. Growth Differ.*, **48**, 513–523.
85. *Amura, C.R., Marek, L., Winn, R.A., Heasley, L.E.* (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 10791–10802.
86. *Kitazawa, A., Shimizu, N.* (2005) *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 94–99.
87. *Cazillis, M., Gonzalez, B.J., Billardon, C., Lombet, A., Fraichard, A., Samarut, J., Gressens, P., Vaudry, H., Rostene, W.* (2004) *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 798–808.
88. *Kim, E., Clark, A.L., Kiss, A., Hahn, J.W., Wesselschmidt, R., Coscia, C.J., Belcheva, M.M.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33749–33760.
89. *Keller, G.* (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 862–869.
90. *Kabrun, N., Buhning, H.J., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W., Keller, G.* (1997) *Development*, **124**, 2039–2048.



91. Moore, M.A., Shieh, J.H., Lee, G. (2006) *Meth. Enzymol.*, **418**, 208–242.
92. Palis, J., Roberston, S., Kennedy, M., Wall, C., Keller, G. (1999) *Development*, **126**, 5073–5084.
93. Robertson, S.M., Kennedy, M., Shannon, J.M., Keller, G. (2000) *Development*, **127**, 2447–2459.
94. Nakano, T., Kodama, H., Honjo, T. (1994) *Science*, **265**, 1098–1101.
95. Cho, S.K., Webber, T.D., Carlyle, J.R., Nakano, T., Lewis, S.M., Zuniga-Pflucker, J.C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9797–9802.
96. Burt, R.K., Verda, L., Kim, D.A., Oyama, Y., Luo, K., Link, C. (2004) *J. Exp. Med.*, **199**, 895–904.
97. Kyba, M., Perlingeiro, R.C., Daley, G.Q. (2002) *Cell*, **109**, 29–37.
98. Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K.L., Tzukerman, M. (2001) *Diabetes*, **50**, 1691–1697.
99. Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P. (2001) *Science*, **242**, 1389–1394.
100. Shi, Y., Hou, L., Tang, F., Jiang, W., Wang, P., Ding, M., Deng, H. (2005) *Stem Cells*, **23**, 656–662.
101. Kuai, X.L., Cong, X.Q., Li, X.L., Xiao, S.D. (2003) *Liver Transpl.*, **9**, 1094–1099.
102. Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Uemura, Y., Nishimura, Y. (2005) *J. Immunol.*, **174**, 1888–1897.
103. Kim, D.W., Chung, S., Hwang, M., Ferree, A., Tsai, H.C., Park, J.J., Chung, S., Nam, T.S., Kang, U.J., Isacson, O., Kim, K.S. (2006) *Stem Cells*, **24**, 557–567.
104. Shim, J.W., Koh, H.C., Chang, M.Y., Roh, E., Choi, C.Y., Oh, Y.J., Son, H., Lee, Y.S., Studer, L., Lee, S.H. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 843–852.
105. Wei, L., Cui, L., Snider, B.J., Rivkin, M., Yu, S.S., Lee, C.S., Adams, L.D., Gottlieb, D.I., Johnson, E.M. Jr., Yu, S.P., Choi, D.W. (2005) *Neurobiol. Dis.*, **19**, 183–193.
106. Kamochi, H., Kurokawa, M.S., Yoshikawa, H., Ueda, Y., Masuda, C., Takada, E., Watanabe, K., Sakakibara, M., Natuki, Y., Kimura, K., Beppu, M., Aoki, H., Suzuki, N. (2006) *Transplantation*, **82**, 516–526.
107. Shiroy, A., Ueda, S., Ouji, Y., Saito, K., Moriya, K., Sugie, Y., Fukui, H., Ishizaka, S., Yoshikawa, M. (2005) *World J. Gastroenterol.*, **11**, 4161–4166.
108. Tabata, Y., Ouchi, Y., Kamiya, H., Manabe, T., Arai, K., Watanabe, S. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 4513–4521.
109. Guo, Y., Hangoc, G., Bian, H., Pelus, L.M., Broxmeyer, H.E. (2005) *Stem Cells*, **23**, 1324–1332.
110. Klein, D., Schmandt, T., Muth-Köhne, E., Perez-Bouza, A., Segschneider, M., Gieselmann, V., Brüstle, O. (2006) *Gene Ther.*, **13**, 1686–1695.
111. Wu, L.C., Sun, C.W., Ryan, T.M., Pawlik, K.M., Ren, J., Townes, T.M. (2006) *Blood*, **108**, 1183–1188.
112. Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Casady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., Jaenisch, R. (2007) *Science*, **318**(5858), 1920–1923.
113. Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Хайдарова Н.В., Шугурова И.М., Горностаева С.Н., Иноземцева Л.С., Катруха А.М., Гривенников И.А., Тарантул В.З. (2003) *Онтогенез*, **34**, 224–230.
114. Shugurova, I., Bobrisheva, I., Surkova, I., Grivennikov, I., Tarantul, V. (2002) *Cell. Proliferation*, **35**, 237–245.
115. Manuilova, E. S., Arsenyeva, E. L., Khaidarova, N. V., Shugurova, I. M., Inozemtseva, L. S., Tarantul, V. Z., Grivennikov, I. A. (2008) *International journal of biomedical science*, **4**.

116. Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Хайдарова Н.В., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Ситникова О.В., Тарантул В.З., Гривенников И.А. (2005) Вестник биотехнологии и физико-химической биологии, **2**, 153–158.
117. Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Хайдарова Н.В., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Козаченков К., Гривенников И.А., Тарантул В.З. (2005) Клеточные технологии в биологии и медицине, **3**, 174–179.
118. Liu, Y.P., Dambaeva, S.V., Dovzhenko, O.V., Garthwaite, M.A., Golos, T.G. (2005) Stem. Cells Dev., **14**, 487–492.
119. Zou, G.M., Yoder, M.C. (2005) Biol. Cell., **97**, 211–219.
120. Velkey, J.M., Slawny, N.A., Gratsch, T.E., O'Shea, K.S. (2006) Meth. Mol. Biol., **329**, 233–261.
121. Chen, S., Choo, A.B., Nai-Dy, W., Heng-Phon, T., Oh, S.K. (2007) Stem Cells Dev., **16**, 413–420.
122. Greber, B., Lehrach, H., Adjaye, J. (2007) BMC Dev. Biol., **7**, 46.
123. Zeineddine, D., Papadimou, E., Chebli, K., Gineste, M., Liu, J., Grey, C., Thurig, S., Behfar, A., Wallace, V.A., Skerjanc, I.S., Pucéat, M. (2006) Dev. Cell, **11**, 535–546.
124. Manabe, T., Tatsumi, K., Inoue, M., Makinodan, M., Yamauchi, T., Makinodan, E., Yokoyama, S., Sakumura, R., Wanaka, A. (2007) Cell Death Differ., **14**, 1080–1085.
125. Wang, Y.Y., Deng, X., Xu, L., Gao, F., Flagg, T., May, W.S. (2007) Exp. Hematol., available online 26 November 2007.
126. Jeong, C.H., Lee, H.J., Cha, J.H., Kim, J.H., Kim, K.R., Kim, J.H., Yoon, D.K., Kim, K.W. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 13672–13679.
127. Wang, B.B., Lu, R., Wang, W.C., Jin, Y. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun., **347**, 1129–1137.
128. Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006) Cell, **126**, 663–676.
129. Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2007) Nature, **448**(7151), 313–317.
130. Yamanaka, S. (2008) Cell Prolif., **41** Suppl 1, 51–56.
131. Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S. (2008) Science, Feb 14.
132. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007) Cell, **131**, 861–872.
133. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S. (2008) Nat. Biotechnol., **26**, 101–106.
134. Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., Daley, G.Q. (2008) Nature, **451**(7175), 141–146.
135. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A. (2007) Science **318** (5858), 1917–1920.