

УДК 611.013, 615.36, 576.32.36
©Борисенко

ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Г.Г. Борисенко

ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, 119992, Москва,
ул. М. Пироговская, д. 1а, тел./факс: (499)246-4293; эл. почта: grigoryb@yahoo.com

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека сохраняют плюрипотентность в культуре, способны к неограниченному росту и дифференцируются во все типы соматических клеток. Эти уникальные свойства делают их исключительным источником тканей для трансплантации и создают перспективы для разработки новых подходов к терапии неизлечимых заболеваний. В данном обзоре мы предприняли попытку рассмотреть основные достижения, сделанные в области изучения эмбриональных стволовых клеток, и проанализировать те нерешённые проблемы, которые стоят на пути их применения в клинике, включая разработку стандартов получения и культивирования, поиск характерных маркеров и создание протоколов направленной дифференциации. Рассмотрено несколько стратегий терапевтического применения ЭСК, включая (1) получение аутологических клеток с помощью терапевтического клонирования; (2) создание иммунной толерантности к аллогенным донорным клеткам с помощью гематопозитического химеризма; (3) создание банков ЭСК линий, совместимых с основными антигенами и обладающих эквивалентной плюрипотентностью. Уделено внимание индуцированным плюрипотентным клеткам, полученным в результате генетической модификации соматических клеток и аналогичным по своим характеристикам эмбриональным. Наш анализ показывает, что критическим ограничением непосредственного использования ЭСК в клинике являются неконтролируемая дифференциация и высокая вероятность тератогенеза. Поэтому основным подходом станет предварительное получение из ЭСК производных дифференцированных клеток, которые хоть и обладают меньшим пролиферативным потенциалом и иммунной привилегированностью, чем ЭСК, но и представляют меньшую опасность для организма. Обзор также демонстрирует, что клеточная терапия является намного более сложным и ресурсоёмким процессом, чем лекарственная терапия, и поэтому получение и использование плюрипотентных клеток требует дальнейшего изучения и совершенствования, прежде чем метод сможет эффективно и безопасно применяться в клинике.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные клетки, клеточная терапия.

ВВЕДЕНИЕ. Изучение стволовых клеток является одним из наиболее быстроразвивающихся направлений мировой медико-биологической науки. Яркие фундаментальные открытия и широкие прикладные перспективы в фармакологии и терапии привлекли в эту область существенное финансирование и вызвали широкий общественный резонанс. Действительно, трудно переоценить значение стволовых клеток для понимания процессов развития организмов, для изучения

механизмов наследственных заболеваний и для тестирования новых лекарственных средств, но наибольший интерес стволовые клетки вызывают в связи с перспективой их применения для регенерации тканей, для лечения рака, а также острых и хронических заболеваний. Способность стволовых клеток к самообновлению, к образованию стабильных линий, к дифференциации в клетки разных тканей и к продукции регуляторных и ростовых факторов делает их чрезвычайно интересным объектом для создания новых терапевтических подходов. Многочисленные сообщения о коррекции разнообразных модельных патологий животных – диабет, повреждение спинного мозга, нейродегенеративные нарушения, заболевания сердца и другие – при помощи стволовых клеток создали предпосылки для их применения в медицине.

Между тем исследовательские работы, как по изучению стволовых клеток, так и по разработке технологий их использования, находятся на относительно раннем этапе развития. Предметом исследований являются механизмы эпигенетической регуляции клеток, внешние факторы, регулирующие дифференциацию, специфические маркёры, субпопуляции прогениторных клеток и многое другое. С биотехнологической точки зрения, дальнейшей оптимизации требуют такие критические моменты, как получение, культивирование, направленная дифференциация и введение клеток реципиенту. Доклинические и первые клинические испытания выявили дополнительные проблемы как общие, так и специфичные для терапии конкретных патологий. Этические вопросы и проблемы биологической безопасности применения стволовых клеток также являются предметом горячих научных и политических дискуссий. Более того, следует признать, что направление по изучению стволовых клеток не только привлекло хорошее финансирование и пристальное внимание массмедиа, во-многом обусловленное ожиданием новой технологической панацеи в медицине, но и сгенерировало большое количество противоречивых (и не всегда воспроизводимых) результатов. В связи с этим, представляется очевидной необходимость сбалансированного и кропотливого анализа ситуации в данной области с точки зрения клинических перспектив.

На наш взгляд, в современном развитии области стволовых клеток можно выделить несколько направлений, которые включают эмбриональные стволовые клетки (ЭСК, – тотипотентные клетки, выделенные из эмбрионов на ранних стадиях развития и способные к неограниченной пролиферации и дифференциации), индуцированные плюрипотентные клетки (ИПК, – induced pluripotent cells или iPC, – плюрипотентные клетки, полученные в результате генетической модификации соматических клеток и аналогичные эмбриональным по своим характеристикам), и мультипотентные стволовые клетки взрослого организма (adult stem cells), – клетки разной степени дифференциации, выделенные из разных тканей. Эмбриональные стволовые клетки вызвали наибольший интерес с точки зрения перспектив клинического применения, благодаря своей уникальной пластичности и способности формировать любые виды клеток организма. В данном обзоре основное внимание сфокусировано на плюрипотентных стволовых клетках (ЭСК и близких к ним по свойствам ИПК), рассмотрены последние достижения в их изучении и проанализированы возможности их применения в терапевтических целях. Определённое внимание уделено вопросам, касающимся создания банков стволовых клеток, терапевтического клонирования человека и смешанного химеризма.

1. ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ.

Впервые эмбриональные клетки были получены почти 30 лет назад из внутренней клеточной массы бластоцисты¹ мышей [1, 2], а 10 лет назад были

¹ Бластоциста – предимплантационная стадия развития эмбриона. Бластоциста состоит из 64-х клеток, образуется на 5-7 день после оплодотворения и представляет собой полую сферу, состоящую из трофобласта (наружный слой клеток, который даёт начало плаценте) и внутренней клеточной массы, из которой формируется сам эмбрион.

получены первые человеческие клеточные линии ЭСК [3]. Согласно определению, ЭСК – это клетки выделенные из эмбриональной ткани до имплантации (1), обладающие способностью формировать клетки всех трёх зародышевых листков (эктодермального, мезодермального и энтодермального) (2), способные к длительной пролиферации (3) и поддержанию плюрипотентного состояния (4). Прямым доказательством тотипотентности ЭСК *in vivo* послужили эксперименты по созданию химер ЭСК и интактных эмбрионов мышей, которые показали, что ЭСК участвуют в формировании всех тканей взрослого организма, включая половые клетки [4].

1.1. Получение и поддержание ЭСК человека.

Источником человеческих ЭСК обычно являются “избыточные” эмбрионы, полученные при клиническом *оплодотворении in vitro*. ЭСК получают из внутренней клеточной массы, выделенной хирургически из эмбриона на стадии бластоцисты, до того как произошла имплантация. Доля успешных попыток получения линий в независимых лабораториях варьирует от 5 до 100%, что указывает на существенные различия в методиках их получения (см. обзор Hoffman L. [5]).

Культивирование линий ЭСК направлено на их размножение, поддержание плюрипотентности и стабильности фенотипических и кариотипических характеристик. Ведение ЭСК производится в присутствии эмбриональных или зрелых соматических клеток (“фидер”-клетки), которые обеспечивают секрецию необходимых ростовых факторов. Наиболее часто в качестве “фидер”-клеток используются мышечные эмбриональные фибробласты, однако эта система не подходит для культивации клеток клинического качества ввиду потенциальной опасности неизвестной вирусной или бактериальной контаминации, а также иммунной реакции со стороны реципиента в ответ на компоненты животного происхождения, метаболически встроенные в ЭСК (например, сиаловые кислоты [6]). В связи с этим активно ведутся разработки систем поддержания ЭСК на эмбриональных клетках человека или вообще без “фидер”-клеток.

Желательно избегать любых ксеногенных компонентов при культивировании, в том числе применения животной сыворотки, в качестве которой обычно используется телячья эмбриональная сыворотка. Возможность такого культивирования клеток была показана Amit с соавт., в руках которых линия ЭСК сохраняла нормальный кариотип и плюрипотентность в течении 50 пассажей на заместителях сыворотки, ростовых факторах (FGF-2, TGF- β , LIF) и фибронектине в качестве субстрата для адгезии [7]. Заместители сыворотки однако содержат материал животного происхождения (в том числе, бычий сывороточный альбумин), поэтому оптимальным вариантом представляется использование белков, выделенных из крови человека, или их рекомбинантных аналогов [8]. Традиционные адгезивные субстраты, такие как фибронектин и матригель, также являются экстрактами животного происхождения и содержат животные белки. Одним из вариантов их замещения является покрытие культуральной посуды высушенной человеческой сывороткой [9] или компонентами человеческого происхождения (ламинин из плаценты, фибронектин из сыворотки крови человека). То же самое касается и ферментов, используемых для диссоциации клеток при пересеве.

Не только академические лаборатории, но и целый ряд компаний, инвестирующих в развитие технологий и рынка стволовых клеток, занимаются разработкой “гуманизированных” систем для культивации. Ведущие компании на рынке клеточных культур, включая StemCell Technologies, BD Biosciences, Invitrogen, Millipore уже предлагают “гуманизированные” культуральные среды для ЭСК. Однако следует заметить, что эти разработки пока ещё находятся в стадии развития и требуют тестирования на многочисленных клеточных линиях. В конечном счёте, получение и ведение линий ЭСК для клиники должно быть стандартизировано и эти стандарты качества (good manufacture practice, GMP)

должны включать не только диагностику доноров эмбриональных клеток и сыворотки на наличие инфекций, но и использование полностью “гуманизированных” сред, субстратов и реагентов. Крайне желательным является также применение методов и автоматизированных технологий, минимизирующих “человеческий фактор”. На сегодняшний день создано порядка 200 линий ЭСК человека, подавляющее большинство которых было получено и культивировалось в присутствии сывороток и “фидер”-клеток животного происхождения [10]. Существуют также системы для получения линий ЭСК человека с минимальным участием животных компонентов, но говорить о стандартах получения и культивирования линий “кинического качества” пока преждевременно [11].

1.2. Характеристики ЭСК человека.

Помимо принципиальных функциональных особенностей, указанных выше, ЭСК человека обладают эуплоидным кариотипом, характерными морфологией и эпигенетическим статусом, стабильно экспрессируют ряд эмбриональных маркёров. Разумеется, все эти особенности должны сохраняться в ходе культивирования. Однако, анализ данных показывает, что клетки могут меняться и что эти перемены могут носить онкогенный характер. Следовательно, обязательным условием культивирования является периодический анализ биохимических, морфологических, эпигенетических и цитологических параметров.

1.2.1. Морфология.

С морфологической точки зрения, ЭСК характеризуются округлой формой, большим размером ядра по отношению к цитоплазме и способностью формировать однослойные колонии при культивировании [3].

1.2.2. Биохимия.

Характерной чертой ЭСК является высокая теломеразная активность², которая свидетельствует о её высоком пролиферативном потенциале, и высокая активность щелочной фосфатазы, которая стремительно снижается при дифференциации ЭСК [3, 12].

1.2.3. Маркёры.

Для характеристики ЭСК используют ряд поверхностных гликолипидов и гликопротеинов. Одни из них были обнаружены также на эмбрионах в стадии бластоцисты (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81), в то время как другие были описаны ранее на разнообразных стволовых клетках (CD117, CD135, CD9 и др.) [5]. Остаётся открытым вопрос относительно специфичности этих антигенов, поэтому, как правило, используются целые панели “стволовых” маркёров. Но и при этом условии анализ маркёров недостаточен, т.к. они могут продолжать экспрессироваться даже после того, как клетка стала анеуплоидной или претерпела онкогенную трансформацию [13].

1.2.4. Профиль экспрессии.

На высоком уровне в ЭСК экспрессируется более 300 генов. Наибольший интерес среди них представляет экспрессия факторов транскрипции, участвующих в поддержании плюрипотентности клеток, – Oct4, Nanog, Sox2, Foxd3, Rex1, UTF1 и др. [14]. Стоит отметить, что эти факторы (например, Oct4) неспецифичны для ЭСК и могут быть активны в различных зрелых мультипотентных клетках. Они также могут экспрессироваться в трансформированных клетках.

1.2.5. Цитогенетический анализ.

Для многих линий ЭСК продемонстрировано сохранение нормального кариотипа после 100 и даже 140 пассажей [15, 16]. Именно этим подтверждается неограниченность их деления, и это отличает их от соматических клеток, которые либо гибнут, либо приобретают аномальный кариотип после 40 (или менее) пассажей [17]. Однако, несколько научных групп сообщили о появлении в линиях ЭСК трисомии по 12 и 17 хромосомам, характерной

² Теломераза – рибонуклеопротеин, который наращивает повторы на концах хромосом и, таким образом, поддерживает длину теломер. Длина теломер напрямую связана со способностью клетки к репликации.

для эмбриональной карциномы человека, и анеуплоидии [18, 19], что указывает на необходимость цитогенетического анализа при долговременном культивировании клеток.

1.2.6. Эпигенетический анализ.

Hoffman и Carpenter сообщили о ряде эпигенетических изменений в ЭСК в ходе культивирования. В частности, авторы наблюдали инактивацию X хромосомы в нескольких линиях [5]. Кроме того, в ЭСК были обнаружены нарушения геномного импринтинга – функциональной неэквивалентности родительских аллелей одного гена, которая достигается путём эпигенетической модификации специфического хромосомного региона (например, путём метилирования цитозиновых оснований) и приводит к полному или частичному выключению родительского аллеля. Нарушение метилирования в некоторых регионах (IGF2 и H19) приводит к биаллельной экспрессии генов, которую связывают с развитием наследственных заболеваний и канцерогенезом [20, 21]. Следовательно, при долговременном культивировании и дифференцировке необходима оценка эпигенетического статуса клеток.

1.3. Дифференциация ЭСК человека.

Плюрипотентность ЭСК человека оценивают по их способности образовывать тератомы после инъекции в иммунодефицитную мышь и по образованию в тератомах клеток трёх зародышевых листков. Образование эмбрионидных телец³ с последующим развитием эктодермы, мезодермы и энтодермы является другим проявлением плюрипотентности и служит моделью для её оценки. Оба теста являются качественными, и следует признать, что на сегодняшний день не существует количественного метода анализа этого фундаментального свойства ЭСК.

Как отмечено выше, при инъекции в организм ЭСК образуют разнообразные тератомы и их контролируемая дифференциация в нужные ткани в нужном месте на данном этапе развития технологий не реализуема. Например, весьма поучительной оказалась попытка трансплантировать ЭСК мышей в сердце. Согласно ранним сообщениям, такая трансплантация существенно улучшала функционирование сердечной мышцы после инфаркта, а наблюдавшийся эффект объяснялся дифференцировкой ЭСК в кардиомиоциты [22, 23]. Однако последующие исследования показали, что трансплантация ЭСК приводит к образованию в сердце тератом, содержащих хрящевые и костные ткани и, следовательно, исключает присутствие в сердце микроокружения, направляющего дифференциацию ЭСК [24].

Таким образом, основным стратегическим подходом к применению ЭСК является их предварительная дифференциация в клетки определённого типа ткани и полная элиминация недифференцированных клеток. Существенные усилия научного сообщества, направленные на изучение дифференциации *in vitro*, уже дали значительные результаты. Применяя сортировку клеток по поверхностным маркерам и методы градиентного разделения клеток, из многочисленных типов клеток, присутствующих в эмбриональных тельцах, удалось получить популяции, обогащённые определённым типом клеток [25, 26]. Более того, удалось направить дифференциацию по заданной линии используя активацию определённых факторов транскрипции, набор специфических ростовых факторов, и сокультивацию с клетками, способными индуцировать дифференцировку в заданном направлении [27, 28]. В результате были получены клетки эктодермального (нейроэктодерма, моторные нейроны, олигодендроциты, кератиноциты), мезодермального (кардиомиоциты, все кроветворные клетки) и энтодермального рядов (гепатоциты, β -клетки поджелудочной железы) (см. например, обзор Trounson A. [13]).

³ Эмбрионидные тельца – образуются из ЭСК при выращивании клеток в состоянии “подвешенной капли”. Эта сложная культуральная система создаётся с помощью сред и культурального пластика, не поддерживающих прикрепление и распластывание клеток, и используется для дифференциации.

Невзирая на бурное развитие в этом направлении, необходимо отметить ряд нерешённых проблем:

1. Большинство существующих протоколов позволяет индуцировать желаемую дифференциацию лишь в небольшом проценте клеток.

2. Все линии ЭСК существенно отличаются друг от друга по способности дифференцироваться в определённом направлении [29]. Так, исследование 17 линий ЭСК по способности давать потомство кардиоваскулярного ряда показало, что экспрессия маркеров, характерных для этого ряда, варьировала между линиями в пределах порядка, а 7 из 17 линий кардиоваскулярного потомства не дали вообще [30]. Аналогичным образом выглядит ситуация с дифференциацией разных линий в инсулин-продуцирующие панкреатические β -клетки. К сожалению, данные сравнительного анализа по разным линиям весьма ограничены, но, предположительно, это явление связано с эпигенетическими и генетическими различиями, а эмбриональной стадией на момент выделения и, следовательно, необходимо получение новых ЭСК линий, способных развиваться в заданный тип ткани или, ещё лучше, обладающих одинаковым плюрипотентным потенциалом.

3. Условия культивации клеток при длительном ведении также могут отражаться на их плюрипотентных способностях, а, следовательно, необходимо изучение этих эффектов и поиск оптимальных условий культивирования.

4. Мультипотентные прогениторные клетки определённого ряда *in vivo* могут дать разнообразное потомство в неконтролируемом порядке (например, мультипотентные прогениторные кардиоваскулярные клетки (ISL1+ клетки) могут дифференцироваться в кардиомициты, пейсмекеры, гладкомышечные и эндотелиальные клетки) [31], поэтому для достижения заданного терапевтического эффекта необходимо получить из ЭСК гомогенные популяции прогениторов каждого типа клеток данного ряда. Для этого необходимо изучение путей дифференциации и создание карт дифференциации клеток каждой ткани (подобно тем, что существуют для миелоидных клеток).

5. Лишь немногие маркеры, используемые для оценки дифференцировки клеток, являются специфичными, что требует применения целых панелей для анализа, а также проведения дополнительных исследований направленных на поиск новых маркеров.

6. Необходимо развитие технологии элиминации из дифференцированной линии не только исходных плюрипотентных клеток, но и производных мультипотентных прогениторных клеток, так как последние могут прекратить дифференцировку *in vivo* и начать пролиферировать с образованием опухоли, как это было показано недавно в случае с нейрональными прогениторными клетками трансплантированными в мозг крысы [32].

В заключение этой части обзора необходимо подчеркнуть, что хотя линии ЭСК, с которыми работают в разных лабораториях мира и соответствуют основному определению, однако вариации в их получении, культивировании и характеристики, а также различия в их поведении (в первую очередь, в отношении дифференциации) вызывают закономерный вопрос, – а насколько правомерно относить эти разные линии к единой группе? Как сопоставлять полученные на них результаты исследований? Где гарантии того, что будучи направленными в клинику, линии из разных источников не дадут неожиданных побочных эффектов? Для ответа на эти вопросы уже предприняты первые шаги в направлении стандартизации и систематизации культур ЭСК. Например, в США в 2005 году создан Национальный Банк Стволовых Клеток, в задачи которого входит поддержание, полная характеристика линий (включая, маркеры плюрипотентности, профили экспрессии, кариотип и т.д.) и их предоставление для исследований (в банке более 20 линий). А крупное объединение Международная Инициатива Стволовой Клетки провела титаническое исследование 59 линий из разных источников и показала высокую степень фенотипического сходства между ними

[33]. Однако, эти обнадёживающие инициативы, очевидно, требуют дальнейшего развития и систематизации.

2. СТРАТЕГИИ ПРИМЕНЕНИЯ ЭСК В КЛИНИКЕ.

Наиболее многообещающие терапевтические подходы с применением ЭСК предполагают трансплантацию в органы реципиента дифференцированных ЭСК. Однако, если трансплантат будет создан из клеток другого донора (аллогенный трансплантат), то он неизбежно вызовет иммунный ответ хозяина. Иммунная реакция может быть индуцирована молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС-1 и МНС-2)⁴, малого комплекса антигенов гистосовместимости (Н антигенами), антигенами группы крови АВО, и, наконец, фетальными антигенами, которые могут быть расценены иммунной системой взрослого организма как чужеродные. Наибольшей иммуногенностью обладают антигены МНС и АВО.

ЭСК экспрессируют низкий уровень МНС-1 и не экспрессируют МНС-2. Низкий уровень МНС-1 связан с подавлением в клетках системы процессинга антигена, подобно тому как это происходит в раковых клетках [34]. С одной стороны, это обеспечивает условия для пересадки ЭСК любому реципиенту, но с другой, - создаёт опасность неконтролируемой гиперпролиферации ткани. В ходе дифференциации ЭСК уровень МНС-1 возрастает в несколько раз, в то время как МНС-2 по прежнему отсутствует [35]. Воспалительные процессы, которые могут сопровождать заболевание реципиента или саму трансплантацию, вызывают миграцию в ткань лимфоцитов и секрецию интерферона- γ (сильного индуктора экспрессии МНС-1 на ЭСК) и, тем самым, могут способствовать отторжению.

Ряд сообщений указывает на то, что ЭСК обладают иммунной привилегией (то есть не вызывают иммунного ответа или способны его ингибировать) и могут выживать и развиваться при аллогенной пересадке [22, 36, 37]. Li и соавторы нашли, что дифференцированные ЭСК также сохраняют иммунную привилегию [12], а группа Drukker смогла приживить мышам ткани, полученные из ЭСК человека, [38]. Однако большинство экспериментов на животных указывают на отторжение ЭСК и их производных [24, 39, 40]. Детальные исследования показывают, что если сами ЭСК и менее иммуногены, то ткани, выращенные из них, так же иммуногенны, как и любые другие аллогенные ткани. Однако, к таким тканям легче индуцировать иммунную толерантность, что обусловлено пониженным уровнем экспрессии МНС-1, отсутствием в ткани антиген-презентирующих клеток донора, которые стимулируют отторжение, и повышенной продукцией ЭСК-производными противовоспалительного цитокина TGF- β , который оказывает иммуносупрессорное действие на Т-лимфоциты хозяина [41].

Для того чтобы избежать отторжения производных из ЭСК клеток при трансплантации, предложено несколько подходов. Основные из них включают: создание специфичных для реципиента (*аутологичных*) линий ЭСК (1); создание банка линий ЭСК, отвечающего антигенному разнообразию большей части населения (2); создание химер клеток иммунной системы (3). Рассмотрим эти подходы последовательно.

2.1. Создание банков ЭСК.

Избежать реакции на антигены АВО несложно, если получать ЭСК клетки от доноров универсальной группы О. Популяционное разнообразие МНС гаплотипов могло бы быть охвачено созданием банка ЭСК, полученных всего от 150 доноров с определённой комбинацией МНС молекул [42]. Разумеется, такой банк должен отвечать всем клиническим требованиям (см. п.п. 1.1–1.3) и содержать клетки с

⁴ МНС-1 и МНС-2 - основные антигенпрезентирующие молекулы в организме. МНС-1 расположены на поверхности почти всех клеток, с ними связано отторжение трансплантата. МНС-2 расположены на поверхности антигенпрезентирующих клеток, В- и некоторых Т-лимфоцитов; эти молекулы играют решающую роль в стимулировании пролиферации Т-клеток и развитии иммунного ответа. Н антигены расположены на всех клетках, они менее иммуногенны, чем МНС молекулы, однако способны вызывать Т-клеточный иммунный ответ и отторжение трансплантата даже при условии полного совпадения МНС антигенов.

равным и высоким плюрипотентным потенциалом. Как уже отмечено выше, большинство из этих условий пока ещё далеко от конечной реализации, но создание национальных, академических и коммерческих банков ЭСК человека для исследовательских целей идёт полным ходом. Хорошо охарактеризованные культуры предлагают US National Stem Cell Bank (США), UK Stem Cell Bank (Великобритания), ES Cell International (Сингапур), Cellartis (Швеция), Millipore (США), Advanced Cell Technology (США) и др.

Насколько создание таких банков сможет решить проблемы всего населения неочевидно, ведь существуют ещё Н антигены и антигены, специфичные для эмбрионов. Н антигены менее иммуногенны по сравнению с МНС и АВО, однако разница даже по одному Н антигену достаточна для того, чтобы привести к отторжению трансплантата [41]. Нельзя сбрасывать со счетов и фетальные антигены, которые могут оказаться на поверхности ЭСК клеток или их производных и вызвать иммунную реакцию, так как они не представлены в тимусе. Таким образом, трансплантация таких клеток может потребовать длительной иммуносупрессивной терапии, а значит, необходимо разрабатывать иные подходы, например создать аутологичные клетки или индуцировать иммунную толерантность.

2.2. Создание аутологичных линий ЭСК с помощью терапевтического клонирования.

Одним из потенциальных способов получения аутологичных ЭСК является перенос ядра соматической клетки пациента в ооцит с предварительно удалённым ядром и последующее получение стабильной линии стволовых клеток (“терапевтическое клонирование человека”) [43]. Получение таких линий могло бы полностью ликвидировать проблему отторжения трансплантата.

Стоит отметить, что метод переноса соматических ядер (nuclear transfer stem cells, NTSC) впервые был успешно использован для *репродуктивного клонирования* овцы [44] и затем воспроизведён на других видах млекопитающих, включая мышей, крыс, свиней, коров и т.д. [45]. Перспективы применения NTSC для репродуктивного клонирования огромны, и этот метод уже успешно использован для разведения животных, для спасения животных, находящихся на грани вымирания, для создания моделей заболеваний человека на животных и для доклинического тестирования новых терапевтических подходов в медицине [47-51]. Получение ЭСК мышей и коров методом NTSC уже является хорошо поставленной технологией [52, 53]. Однако эффективность репродуктивного клонирования пока чрезвычайно низка (в среднем 6%), так как требует координации клеточного цикла реципиентной и донорной клетки, реконструкции хроматина, перепрограммирования экспрессии генов, реинициации эмбрионального развития и, наконец, высокого технического профессионализма операторов [54].

2.2.1. Терапевтическое клонирование приматов и человека.

Применение NTSC для клонирования приматов оказалось гораздо более трудной задачей. Репродуктивного клонирования приматов осуществить не удалось; более того, лишь в конце 2007 года появилось первое достоверное сообщение об успешном выделении двух линий ЭСК из эмбрионов макаки, полученных путём NTSC [55]. Получение ЭСК человека этим методом (терапевтическое клонирование) до сих пор не дало положительных результатов. Единственное “успешное” сообщение сделанное Hwang W.S. с соавторами, оказалось результатом подтасовки данных и вылилось в скандал, вскрывший неэтичное отношение к пациентам и нецелевое использование финансовых средств [56, 57]. На данный момент, двум научным группам удалось получить с помощью переноса ядер клонированные бластоцисты человека, причём группа French добилась воспроизводимости клонирования, но стабильные линии клеток из этих бластоцистов пока не получены [58, 59]. Между тем, согласно последним данным группы Миталипова, эффективность получения ЭСК макаки путём NTSC составила всего 0,7% [55]. Это означает, что ещё предстоит существенно улучшить

технологии получения ЭСК приматов прежде, чем этот метод окажется применимым в клинике для терапевтического клонирования.

2.2.2. Проблемы на пути развития терапевтического клонирования человека.

Можно выделить несколько серьёзных проблем, стоящих на пути развития терапевтического клонирования человека. Во-первых, как показывает опыт клонирования животных, успех методологии во многом зависит от качества ооцитов [60]. Между тем, сама по себе доступность ооцитов человека на сегодняшний день весьма ограничена и представляет собой основную проблему для научных исследований и для разработки NTSC. Во-вторых, ключевым моментом в ходе NTSC является репрограммирование эпигенетических модификаций соматического генома, соответствующих дифференцированному состоянию. Компоненты цитоплазмы ооцита должны выключить экспрессию генов, специфичных для соматической клетки и включить экспрессию эмбриональных генов, связанных с плюрипотентностью стволовой клетки. Неполное выключение генов соматической клетки приводит к нарушению развития эмбриона [61]. Между тем, факторы, контролирующие и влияющие на перепрограммирование генома, ещё недостаточно хорошо изучены. В-третьих, в эмбриональную клетку попадает митохондриальная ДНК ооцита, и если при NTSC используется слияние нескольких ооцитов, то возникает митохондриальная гетероплазмия, и в полученной клетке присутствует митохондриальная ДНК от нескольких организмов. Согласно данным, полученным на животных, эта гетероплазмия не имеет существенного значения для развития эмбриона, однако её потенциальная роль в терапевтическом клонировании человека неизвестна [62-64]. В-четвёртых, критическим этапом в ходе NTSC является возобновление мейоза и восстановление клеточного цикла [65]. Методы химической и электрической стимуляции, применяемые для запуска этих процессов, мягко говоря, недостаточно хорошо имитируют процесс оплодотворения и, как следствие, вносят свой вклад в низкую эффективность NTSC. Наконец (5), существенную роль в развитии эмбриона играют условия культивирования [66], но понимание того, какие именно условия нужны эмбриону оставляет желать лучшего и, соответственно, требуются дальнейшие поиски для их оптимизации.

В заключение необходимо отметить, что даже если все вышеперечисленные вопросы будут решены, неясно насколько доступным окажется терапевтическое клонирование с экономической точки зрения и насколько оправданным с медицинской, – ведь метод требует существенных затрат как ресурсов так и времени, которого у пациента может и не быть.

2.3. Создание иммунной толерантности для трансплантации стволовых клеток.

Изучение механизмов возникновения иммунной толерантности (отсутствие реакции в отношении антигена) и методов её индукции началось почти 100 лет назад с работ Уэлса (1911) [67]. Сегодня индукция толерантности применяется в терапевтических целях, в том числе и при трансплантации, однако основная цель – достижение стабильной толерантности без длительной иммуносупрессии – всё ещё остаётся предметом научного поиска.

Иммунная толерантность бывает центральной и периферической. Центральная толерантность подразумевает негативную селекцию Т-клеток в тимусе⁵, которая обеспечивает удаление всех аутореактивных лимфоцитов.

⁵ Тимус является центральным органом, в котором происходит формирование ауто толерантности. В тимусе происходит дифференциация гематopoэтических стволовых клеток в Т-лимфоциты, которые затем подвергаются позитивному и негативному отборам. Под негативным отбором понимают удаление тех Т-клеток, которые способны связываться с высокой афинностью с аутоантигенами, представленными на поверхности антиген-презентирующих клеток медуллярной зоны тимуса. Антиген-презентирующие клетки этой зоны – это дендритные клетки, которые также являются линией гематopoэтического ряда.

Периферическая (посттимическая) толерантность может быть реализована через генерацию толерогенных дендритных клеток и через индукцию регуляторных Т-клеток на периферии.

Манипулирование центральной толерантностью возможно путём создания гематопозитического химеризма. Трансплантация гематопозитических стволовых клеток (ГСК) животному с подавленной иммунной системой приводит к приживлению и сосуществованию ГСК донора и реципиента (смешанный химеризм). ГСК донора дают в качестве потомства антигенпрезентирующие клетки, которые мигрируют в тимус, обеспечивают негативную селекцию Т-клеток, несущих рецепторы к антигенам донора, и формируют толерантность к клеткам донора [68-69]. ГСК могут быть также получены путём дифференциации ЭСК и использованы для создания миелоидного и тимического химеризма, который может обеспечить формирование иммунной толерантности к последующей трансплантации клеток ЭСК и их производных [70, 71]. Недавно гематопозитический химеризм был описан для человека, – трансплантация печени 9-ти летней девочке с резус-отрицательной группой крови от юноши с резус-положительной группой привела к приживлению трансплантата и образованию химеризма, который характеризовался сменой группы крови с резус-отрицательной на резус-положительную и преобладанием в крови лейкоцитов с мужским набором хромосом (XY), – эффект, который может быть объяснён приживлением ГСК донора, находившихся в трансплантированной печени [72]. Следует однако заметить, что установление стабильного химеризма возможно только при активно функционирующем тимусе, т.е. в предпубертантном возрасте. Восстановление активности тимуса во взрослом организме является непростой медицинской задачей.

Отторжение трансплантата может быть отчасти предотвращено и на периферии путём блокады иммунной стимуляции и генерации толерогенных дендритных клеток, которые являются иммуносупрессорами и способствуют выживанию трансплантата [73]. Индукция регуляторных Т-клеток, известных своими иммуносупрессорными свойствами, может быть использована для подавления иммунного ответа и отторжения [74, 75]. Дендритные клетки также могут индуцировать образование регуляторных Т-клеток [76] и, следовательно, трансплантация дендритных клеток выведенных из ЭСК могла бы способствовать образованию регуляторных Т-клеток специфичных для ЭСК и потомков [77].

2.4. Проблемы применения ЭСК в терапевтических целях.

Любое терапевтическое вмешательство имеет, по-крайней мере, три аспекта – метод лечения, заболевание и пациент с его индивидуальными особенностями. До сих пор мы уделяли внимание лишь разработке метода клеточной терапии ЭСК, между тем, каждое заболевание требует решения специфических задач и накладывает определённые ограничения на применимость метода. В этом разделе обзора будут рассмотрены проблемы, возникающие при использовании клеточной терапии для лечения конкретного заболевания.

Доклинические исследования по терапевтическому применению ЭСК на различных модельных патологиях у животных дали неоднозначные и часто противоречивые результаты, поэтому неудивительно, что клинические испытания ЭСК человека не проводились. Однако, применение ЭСК, по-видимому, будет включать дифференциацию в прогениторные клетки перед трансплантацией. Поскольку клинические испытания по терапевтическому применению мультипотентных стволовых клеток идут во многих странах мира, постольку результаты этих испытаний могут дать неоценимый урок относительно возможного использования ЭСК. Для того, чтобы проиллюстрировать потенциальные проблемы применения ЭСК рассмотрим в качестве примера, состояние исследований в области терапии мультипотентными клетками инфаркта миокарда.

Первая нерешённая проблема – это выбор типа стволовых клеток для терапии. Теоретические основы для такого выбора пока недостаточно разработаны, однако в экспериментальном плане уже применяются миообласты

скелетных мышц, гематопозитические клетки костного мозга, эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) и мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Клинические испытания по применению миобластов дали неоднозначные результаты и некоторые из них были прекращены из-за отсутствия положительных результатов [78]. Гематопозитические клетки, согласно первоначальным данным, полученным на мышах, могут трансдифференцироваться в кардиомиоциты при пересадке в зону инфаркта и восстанавливать сердечные функции [79]. Однако последующие исследования не подтвердили эти наблюдения [80, 81]. Клинические испытания по трансплантации ЭПК, МСК и моноклеарных клеток костного мозга выявили небольшое сокращение зоны инфаркта и частичное восстановление сердечных функций [82]. Механизм этих пусть и небольших, но клинически значимых эффектов неясен, так как дифференциация данных типов клеток в кардиомиоциты либо незначительна либо вообще не была показана *in vivo* [83].

Способ введения клеток реципиенту (внутрикоронарный или внутримышечный) существенно влияет на эффективность трансплантации, так как он определяет степень потерь клеток через кровеносную систему. Более того, клетки, попавшие в зону инфаркта, оказываются в области воспалительных процессов и большая их часть (>90%) гибнет в течении недели. Обеспечение их выживаемости – следующая нерешённая задача. Наконец, для стабильного восстановления функции сердечной мышцы клетки должны не только дифференцироваться в кардиомиоциты, но и образовать контакты с кардиомиоцитами реципиента, т.е. интегрироваться в ткань миокарда. Все эти (и многие другие) вопросы на сегодняшний день не решены. Более того, положительные эффекты клеточной терапии при инфаркте миокарда связывают не с прямой регенерацией ткани за счёт трансплантированных клеток, а с временными паракринными эффектами (синтезом противовоспалительных цитокинов, факторов роста и т.п.). Иными словами, эффективное применение даже дифференцированных производных ЭСК для терапии конкретных патологий представляет собой далеко нерешённую задачу.

Наконец, важную роль играют индивидуальные особенности пациента. Многочисленные факторы, такие как тяжесть течения заболевания, сопутствующие заболевания, осложнения, состояние иммунной системы и т.д., влияют на выбор терапевтических подходов и их эффективность. Например, анализ результатов клинических испытаний по применению гематопозитических стволовых клеток для лечения инфаркта миокарда неожиданно показал, что положительный терапевтический эффект коррелирует с со степенью повреждений – чем больше зона инфаркта, тем более эффективна терапия [84]. Выбор пациентов для клинических испытаний также может влиять на общий результат [85]. Следовательно, анализ многочисленных факторов (симптомов, анамнеза, прогноза и т.д.) необходим как для понимания результатов испытаний, так и для развития метода.

3. ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ.

Эмбриогенез млекопитающих определяется в основном не генетическими, а эпигенетическими факторами. Поэтому дифференциация, в принципе, является обратимым процессом. Первое клонирование овечки Долли, полученное методом NTSC, отчётливо показало, что генетический аппарат ядра соматической клетки (кариопласт) может быть перепрограммирован в недифференцированное состояние факторами, присутствующими в цитопласте ооцита [86]. Это открытие стало стартовой точкой для поиска тех факторов, которые ответственны за перепрограммирование соматического ядра при NTSC и которые определяют плюрипотентное состояние эмбриональной клетки в норме.

3.1. Получение ИПК.

В 2006 проф. Yamanaka сообщил о создании принципиально нового подхода к получению плюрипотентных клеток, – метода репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки [87]. Суть метода сводится к трансфекции взрослой клетки четырьмя генами (*OCT4*, *SOX2*, *c-MYC* и *KLF4*),

которые кодируют факторы транскрипции, связанные с плюрипотентным состоянием эмбриональных клеток. Первые репрограммированные клетки мышей могли образовывать колонии, неограниченно делиться и образовывали тератомы при трансплантации. К середине 2007 года Yamanaka и ещё две независимых группы усовершенствовали технологию настолько, что смогли получить репрограммированные (индуцированные) плюрипотентные клетки, обладающими всеми свойствами ЭСК [88-90]. Метод оказался настолько простым и доступным, что уже к началу 2008 года три группы смогли получить из клеток кожи человека стабильные линии ИПК, отвечающие всем критериям ЭСК [91-93]. В частности, эти клетки сохраняли нормальный кариотип после нескольких месяцев культивирования, имели высокую теломеразную активность, экспрессировали характерные для ЭСК поверхностные маркеры и гены, образовывали тератомы и эмбриональные тельца и дифференцировались в клетки тканей всех трёх зародышевых листков [92]. Эффективность метода, на первый взгляд, не очень высока (менее 0,02%), но ввиду присутствия миллионов клеток в небольшом биоптате донорской ткани, он позволяет выделять по несколько линий в каждом эксперименте и, таким образом, несёт мощнейший потенциал для получения плюрипотентных (и в том числе, аутологичных) клеток человека.

Технология ИПК облегчает решение целого ряда задач, включая изучение развития и функционирования тканей, доклиническое тестирование новых фармпрепаратов и создание моделей различных заболеваний человека, как для их изучения так и для поиска новых терапевтических подходов. Применение ИПК в клинике помогло бы избежать этических проблем, связанных с использованием эмбрионов, а также сложностей с поиском эмбрионов и применением метода NTSC. Кроме того, ИПК открывают новые возможности как для получения аутологичных стволовых клеток, так и создания банков плюрипотентных клеток.

3.2. Ограничения по применению ИПК в клинике.

Стоит отметить однако, что ИПК линии человека существенно варьируют как по профилю экспрессии, так и плюрипотентному потенциалу. По профилю экспрессии они отличаются также и от ЭСК [92]. Поэтому до постановки клинических задач, необходимо всестороннее изучение этих клеток.

Далее, первоначально для репрограммирования Yamanaka использовал ген *c-MYC*, ассоциированный с развитием рака. Thomson и соавт. выбрали другой набор генов (*OCT3*, *SOX2*, *LIN28* и *NANOG*) и, таким образом, избежали применения опасного онкогена, однако во всех работах применялись ретровирусы в качестве векторов трансфекции клеток, которые могут вызывать мутации и вести к образованию рака в производных тканях. Разработка методов репрограммирования без использования вирусов абсолютно необходима на пути в клинику.

Ещё одним недостатком ИПК по сравнению с ЭСК является то, что взрослые соматические клетки, потенциальные предшественники ИПК, в ходе жизни подвергаются процессам старения и различным стрессорным воздействиям, включая токсические и воспалительные. Накопленные этими клетками мутации и эпигенетические нарушения могут, в принципе, привести к непредсказуемым последствиям при развитии новой ткани из ИПК. На сегодняшний день некоторые специалисты ставят под сомнение применение ИПК в клинике [94].

Остальные проблемы, связанные с потенциальным клиническим применением ИПК, полностью аналогичны проблемам, связанным с ЭСК, – это подбор условий культивации без фидер-клеток и без материалов животного происхождения, это поиск методов направленной дифференциации во всевозможные типы клеток, это элиминация недифференцированных клеток из трансплантата, это получение линий с одинаковым плюрипотентным потенциалом. Невзирая на относительную простоту получения, создание и тестирование линий ИПК всё же требует существенных временных (около года) и финансовых (несколько сотен тысяч долларов США) затрат [95], поэтому аутологичные линии будут доступны не многим клиентам, и создание банка линий с полным разнообразием гаплотипов МНС представляется более реалистичной перспективой.

В заключение необходимо подчеркнуть, что ИПК уже открыли новые горизонты для исследователей, но об их клиническом применении говорить пока преждевременно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Исследования стволовых клеток формируют сегодня огромную и быстро развивающуюся область. Причём эти исследования всё в большей степени разворачиваются в направлении создания новых терапевтических подходов. Потенциальные возможности терапии стволовыми клетками почти безграничны и сегодня активно ведутся исследования по их применению для лечения таких социальных бедствий как диабет, заболевания сердца и нейродегенеративные расстройства.

Неудивительно, что эта область является объектом инвестиций и её финансирование непрерывно растёт. Так, в США в период 2004-2007 годов Национальный Институт Здоровья выделил 2,5 миллиарда долларов на исследования в области стволовых клеток (<http://www.nih.gov/news/fundingresearchareas.htm>). Несколько штатов, неудовлетворённых позицией президента по отношению к эмбриональным стволовым клеткам, провели компании по независимому финансированию проектов по стволовым клеткам и смогли обеспечить инвестиции в размере 4 миллиардов долларов на период ближайших 10 лет [96]. Частные компании также активно включились как в развитие, так и в освоение рынка технологий стволовых клеток. Эти, на первый взгляд, большие инвестиции обеспечат развитие направления, но они могут оказаться недостаточными для прорыва, ведь согласно статистическим данным средние затраты на развитие одного фармпрепарата за рубежом составляют около 0,8 миллиардов долларов. Между тем, клеточные технологии (в особенности стволовые клетки) представляют собой намного более сложный и ресурсоёмкий процесс. А эмбриональные стволовые клетки являются одновременно и наиболее перспективным объектом с точки зрения терапии и наиболее сложным и непредсказуемым с точки зрения организации живых систем. Эта сложность подтверждается противоречивостью результатов, подчас опубликованных в лучших рецензируемых журналах. Обзор текущей литературы также наглядно демонстрирует, что почти все аспекты, касающиеся применения ЭСК человека в клинике, требуют дальнейшего изучения или разработки. Вполне закономерным представляется повышенное внимание к ЭСК как государственных институтов (например, Human Fertilization and Embryology Authority, HFEA, в Великобритании и Food and Drug Administration, FDA, в США), так и научных общественных организаций (например, International Society for Stem Cell Research, ISSCR; National Academy of Science USA, NAS), которые либо напрямую регулируют (HFEA, FDA), либо направляют (ISSCR, NAS) исследования в этой области.

Интересно, что неконтролируемая дифференциация ЭСК при пересадке *in vivo* и высокая вероятность тератогенеза практически исключают прямое применение этих клеток для терапии. ЭСК могут служить лишь источником прогениторных клеток определённой ткани, пригодных для трансплантации человеку. Производные ЭСК обладают меньшим пролиферативным потенциалом, они более иммуногенны, то есть они лишены уникальных свойств ЭСК. Такова плата за биологическую безопасность их применения.

В этом году в Калифорнии стартует первое клиническое испытание по терапевтическому применению при травмах спинного мозга прогениторных олигодендроцитов, полученных из ЭСК человека (<http://www.geron.com/products/productinformation/spinalcordinjury.aspx>). Испытание ведёт компания Geron (США), зарекомендовавшая себя не только успехами в области получения и изучения ЭСК, но и обладающая основными патентами по их терапевтическому применению. Испытание планируется начать после того, как оно будет поддержано FDA и соответствующими комиссиями университетов, участвующих в проекте. Дальнейшее развитие терапевтического использования ЭСК во многом определится результатами этого испытания.

Автор выражает благодарность академику РАМН Ю.М. Лопухину и д.м.н. С.А. Гусеву за творческую дискуссию и полезные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Evans M., Kaufman M.* (1981) *Nature*, **292**, 154-156.
2. *Martin G.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7634-7638.
3. *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.
4. *Bradley A. Evans M., Kaufman M.H., Robertson E.* (1984) *Nature*, **309**, 255-256.
5. *Hoffman L.M., Carpenter M.K.* (2005) *Nat. Biotechnol.*, **23**, 699-708.
6. *Martin M.J., Muotri A., Gage F., Varki A.* (2005) *Nat. Med.*, **11**, 228-232.
7. *Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J.* (2004) *Biol. Reprod.*, **70**, 837-845.
8. *Ludwig T.E., Levenstein M.E., Jones J.M., Berggren W.T., Mitchen E.R., Frane J.L., Crandall L.J., Daigh C.A., Conard K.R., Piekarczyk M.S., Llanas R.A., Thomson J.A.* (2006) *Nat. Biotechnol.*, **24**, 185-187.
9. *Stojkovic P., Lako M., Przyborski S., Stewart R., Armstrong L., Evans J., Zhang X., Stojkovic M.* (2005) *Stem Cells*, **23**, 895-902.
10. *Blow N.* (2008) *Nature*, **451**, 855-858.
11. *Chavez S.L., Meneses J.J., Nguyen H.N., Kim S.K., Pera R.A.* (2008) *Stem Cells Dev.*, **17**, 535-546.
12. *Li L., Baroja M.L., Majumdar A., Chadwick K., Rouleau A., Gallacher L., Ferber I., Lebkowski J., Martin T., Madrenas J., Bhatia M.* (2004) *Stem Cells*, **22**, 448-456.
13. *Trounson A.* (2006) *Endocrine Rev.*, **27**, 208-219.
14. *Pera M.F., Trounson A.O.* (2004) *Development*, **131**, 5515-5525.
15. *Rosler E.S., Fisk G.J., Ares X., Irving J., Miura T., Rao M.S., Carpenter M.K.* (2004) *Dev Dyn.*, **229**, 259-274.
16. *Buzzard J.J., Gough N.M., Crook J.M., Colman A.* (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 381-382.
17. *Saksela E., Moorhead P.S.* (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 390-395.
18. *Draper J.S., Smith K., Gokhale P., Moore H.D., Maltby E., Johnson J., Meisner L., Zwaka T.P., Thomson J.A., Andrews P.W.* (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 53-54.
19. *Brimble S.N., Zeng X., Weiler D.A., Luo Y., Liu Y., Lyons I.G., Freed W.J., Robins A.J., Rao M.S., Schulz T.C.* (2004) *Stem Cells Dev.*, **13**, 585-597.
20. *Mitalipov S., Clepper L., Sritanandomchai H., Fujimoto A., Wolf D.* (2007) *Stem Cells*, **25**, 581-588.
21. *Allegrucci C., Wu Y.Z., Thurston A., Denning C.N., Priddle H., Mummery C.L., Ward-van Oostwaard D., Andrews P.W., Stojkovic M., Smith N., Parkin T., Jones M.E., Warren G., Yu L., Brena R.M., Plass C., Young L.E.* (2007) *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 1253-1268.
22. *Min J.Y., Yang Y., Converso K.L., Liu L., Huang Q., Morgan J.P., Xiao Y.F.* (2002) *J. Appl. Physiol.*, **92**, 288-296.
23. *Singla D.K., Hacker T.A., Ma L., Douglas P.S., Sullivan R., Lyons G.E., Kamp T.J.* (2006) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **40**, 195-200.
24. *Nussbaum J., Minami E., Laflamme M.A., Virag J.A.I., Ware C.B., Masino A., Muskheli V., Pabon L., Reinecke H., Murry C.E.* (2007) *FASEB J.*, **21**, 1345-1357.
25. *Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L.* (2001) *J. Clin. Invest.*, **108**, 407-414.
26. *Xu C., Police S., Rao N., Carpenter M.K.* (2002) *Circ. Res.*, **91**, 501-508.
27. *Trounson A.* (2005) *Reprod. Fertil. Dev.*, **17**, 135-141.
28. *Loebel D.A., Watson C.M., De Young R.A., Tam P.P.* (2003) *Dev. Biol.*, **264**, 1-14.

29. Chien K.R. (2008) *Nature*, **453**, 302-305.
30. Osafune K., Caron L., Borowiak M., Martinez R.J., Fitz-Gerald C.S., Sato Y., Cowan C.A., Chien K.R., Melton D.A. (2008) *Nat. Biotechnol.*, **26**, 313-315.
31. Kattman S.J., Huber T.L., Keller G.M. (2006) *Dev. Cell*, **11**, 723-732.
32. Roy N.S., Cleren C., Singh S.K., Yang L., Beal M.F., Goldman S.A. (2006) *Nat. Med.*, **12**, 1259-1268.
33. Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L., Amit M., Andrews P.W., Beighton G., Bello P.A. et al. (2007) *Nat. Biotechnol.*, **25**, 803-816.
34. Cabrera C.M., Nieto A., Cortes J.L., Montes R.M., Catalina P., Cobo F., Barroso-Del-Jesus A., Concha A. (2007) *Cell Biol. Int.*, **31**, 1072-1078.
35. Drukker M., Katz G., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Eldor J., Reubinoff B., Mandelboim O., Benvenisty N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9864-9869.
36. Behfar A., Zingman L.V., Hodgson D.M., Rauzier J.M., Kane G.C., Terzic A., Puceat M. (2002) *FASEB J.*, **16**, 1558-1566.
37. Hodgson D.M., Behfar A., Zingman L.V., Kane G.C., Perez-Terzic C., Alekseev A.E., Puceat M., Terzic A. (2004) *Am. J. Physiol.*, **287**, H471-H479.
38. Drukker M., Katchman H., Katz G., Even-Tov Friedman S., Shezen E., Hornstein E., Mandelboim O., Reisner Y., Benvenisty N. (2006) *Stem Cells*, **24**, 221-229.
39. Swijnenburg R.J., Tanaka M., Vogel H., Baker J., Kofidis T., Gunawan F., Lebl D.R., Caffarelli A.D., de Bruin J.L., Fedoseyeva E.V., Robbins R.C. (2005) *Circulation*, **112**, 1166-1172.
40. Fairchild P.J., Robertson N.R., Minger S.L., Waldmann H. (2007) *Curr. Opin. Immunol.*, **19**, 596-602.
41. Robertson N.J., Brook F.A., Gardner R.L., Cobbold S.P., Waldmann H., Fairchild P.J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20920-20925.
42. Taylor C.J., Bolton E.M., Pocock S., Sharples L.D., Pedersen R.A., Bradley J.A. (2005) *Lancet*, **366**, 2019-2025.
43. French A.J., Wood S.H., Trounson A.O. (2006) *Stem Cell Rev.*, **2**, 265-276.
44. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. (1996) *Nature*, **380**, 64-66.
45. Kues W.A., Niemann H. (2004) *Trends Biotechnol.*, **22**, 286-294.
46. Valta G., Gjerris M. (2006) *Anim. Reprod. Sci.*, **92**, 211-230.
47. Faber D.C., Ferre L.B., Metzger J., Robl J.M., Kasinathan P. (2004) *Cloning Stem Cells*, **6**, 198-207.
48. Lewis I.M., McClintock A.E., French A.J., Zuelke K.A., Hartord B.A., Trounson A.O. (2000) *Aust. Vet. J.*, **78**, 694-697.
49. Paterson L., DeSousa P., Ritchie W., King T., Wilmut I. (2003) *Anim. Reprod. Sci.*, **79**, 137-143.
50. Wells D.N. (2003) *Reprod., Suppl.*, **61**, 131-150.
51. Wells D.N. (2005) *Rev. Sci. Tech.*, **24**, 251-264.
52. Kishigami S., Wakayama S., van Thuan N., Wakayama T. (2006) *Hum. Cell*, **19**, 2-10.
53. Wang L., Duan E., Sung L.Y., Jeong B.S., Yang X., Tian X.C. (2005) *Biol. Reprod.*, **73**, 149-155.
54. Wells D.N., Forsyth I.T., McMillan V., Oback B. (2004) *Cloning Stem Cells*, **6**, 101-110.
55. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L., Nelson M., Sanger W.G., Gokhale S., Wolf D.P., Mitalipov S.M. (2007) *Nature*, **450**, 497-502.
56. Cho M.K., McGee G., Magnus D. (2006) *Science*, **311**, 614-615.
57. Wohn D.Y., Normile D. (2006) *Science*, **312**, 980-981.
58. Stojkovic M., Stojkovic P., Leary Hall V.J., Armstrong L., Herbert M., Nesbitt M., Lako M., Murdoch A. (2005) *Reprod. Biomed. Online*, **11**, 226-231.
59. French A.J., Adams C.A., Anderson L.S., Kitchen J.R., Hughes M.R., Wood S.H. (2008) *Stem Cells*, **26**, 485-493.
60. Lonergan P., Rizzo D., Gutierrez-Adan A., Fair T., Boland M.R. (2003) *Reprod. Domest. Anim.*, **38**, 259-267.

61. Gao S., Chung Y.G., Williams J.W., Riley J., Moley K., Latham K.E. (2003) *Biol. Reprod.*, **69**, 48-56.
62. Tecirlioglu R.T., Cooney M.A., Lewis I.M., Korfiatis N.A., Hodgson R., Ruddock N.T., Vajta G., Downie S., Trounson A.O., Holland M.K., French A.J. (2005) *Reprod. Fertil. Dev.*, **17**, 573-585.
63. Brenner C.A., Kubisch H.M., Pierce K.E. (2004) *Reprod. Fertil. Dev.*, **16**, 743-751.
64. Santos T.A., Shourbagy S., John I.C. (2006) *Fertil. Steril.*, **85**, 584-591.
65. Alberlo R., Zakhartchenko V., Motlik J., Wolt E. (2001) *Int. J. Dev. Biol.*, **45**, 797-809.
66. Chung Y.G., Mann M.R., Bartolomei M.S., Latham K.E. (2002) *Biol. Reprod.*, **66**, 1178-1184.
67. Wells H.G., Osborne T.B.J. (1911) *Infect. Dis.*, **8**, 66.
68. Ildstad S.T., Sachs D.H. (1984) *Nature*, **307**, 168-170.
69. Ildstad S.T., Wren S.M., Bluestone J.A., Barbieri S.A., Sachs D.H. (1985) *J. Exp. Med.*, **162**, 231-244.
70. Burt R.K., Verda L., Kim D.A., Oyama Y., Luo K., Link C. (2004) *J. Exp. Med.*, **199**, 895-904.
71. Priddle H., Jones D.R., Burridge P.W., Patient R. (2006) *Stem Cells*, **24**, 815-824.
72. Alexander S.I., Smith N., Hu M., Verran D., Shun A., Dorney S., Smith A., Webster B., Shaw P.J., Lammi A., Stormon M.O. (2008) *N. Engl. J. Med.*, **358**, 369-374.
73. Rutella S., Danese S., Leone G. (2006) *Blood*, **108**, 1435-1440.
74. Kawai T., Cosimi A.B., Spitzer T.R., Tolkoff-Rubin N., Suthanthiran M., Saidman S.L., Shaffer J., Preffer F.I., Ding R., Sharma V., Fishman J.A., Dey B., Ko D.S., Hertl M., Goes N.B., Wong W., Williams W.W. Jr., Colvin R.B., Sykes M., Sachs D.H. (2008) *N. Engl. J. Med.*, **358**, 353-361.
75. Joffre O., Santolaria T., Calise D., Al Saati T., Hudrisier D., Romagnoli P., van Meerwijk J.P. (2008) *Nature Med.*, **14**, 88-92.
76. Yamazaki S., Inaba K., Tarbell K.V., Steinman R.M. (2006) *Immunol. Rev.*, **212**, 314-329.
77. Lee M.K., Moore D.J., Jarrett B.P., Lian M.M., Deng S., Huang X., Markmann J.W., Chiaccio M., Barker C.F., Caton A.J., Markmann J.F. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 6539-6544.
78. Cleland J.G., Coletta A.P., Abdellah A.T., Cullington D., Clark A.L., Rigby A.S. (2007) *Eur. J. Heart Fail.*, **9**, 102-108.
79. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. (2001) *Nature*, **401**, 701-705.
80. Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D., Williams D.A., Field L.J. (2004) *Nature*, **428**, 664-668.
81. Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L., Kofidis T., Weissman I.L., Robbins R.C. (2004) *Nature*, **428**, 668-673.
82. Abdel-Latif A., Bolli R., Tleyjeh I.M., Montori V.M., Perin E.C., Hornung C.A., Zuba-Surma E.K., Al-Mallah M., Dawn B. (2007) *Arch. Intern. Med.*, **167**, 989-997.
83. Segers V.F.M., Lee R.T. (2008) *Nature*, **451**, 937-942.
84. Passier R., van Laake L.W., Mummery C.L. (2008) *Nature*, **453**, 322-329.
85. Mathews D.J.H., Sugarman J., Bok H., Blass D.M., Coyle J.T., Duggan P., Finkel J., Greely H.T., Hillis A. et. al. (2008) *Neurology*, **71**, 288-93.
86. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997) *Nature*, **385**, 810-813.
87. Takahashi K., Yamanaka S. (2006) *Cell*, **126**, 663-676.
88. Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R., Plath K., Hochedlinger K. (2007) *Cell Stem Cell*, **1**, 55.

89. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. (2007) *Nature*, **448**, 313.
90. Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. (2007) *Nature*, **448**, 318-324.
91. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007) *Cell*, **131**, 861-872.
92. 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**, 1917-1920.
93. 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**, 141-146.
94. Holden C., Vogel, G. (2008) *Science*, **319**, 560-563.
95. Cyranoski D. (2008) *Nature* **452**, 406-408.
96. Hayden E.C. (2008) *Nature*, **453**, 18-21.

Поступила: 02. 10. 2008.

THE PROSPECT OF PLURIPOTENT STEM CELL-BASED THERAPY

G.G. Borisenko

Research Institute of Physicochemical Medicine, M. Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119992 Russia;
tel./fax: (495)246-4293; e-mail: grigoryb@yahoo.com

Human embrional stem cells (hESC) are able to maintain pluripotency in culture, to proliferate indefinitely and to differentiate into any somatic cell type. Due to these unique properties, hESC may become an exceptional source of tissues for transplantation and have great potencial for the therapy of incurable diseases. Here, we review new developments in the area of embrional stem cells and discuss major challenges – standartization of protocols for cell derivation and cultivation, identification of specific molecular markers, development of new aprouches for directed differentiation etc. – which remain to be settled, prior to safe and successful clinical application of stem cells. We appraise several potential approaches of hESC therapy including derivation of autologous cells via therapeutic cloning (1), generation of immune tolerance to allogenic donor cells via hematopoetic chimerism (2), and development of the banks of hESC lines (3). In addition, we discuss brifly induced pluripotent cells, which are derived via genetic modification of autologous somatic cells and are analogous to ESC. Our analysis demonstrates that uncontrollable differentiation in vivo and teratogenic potential of hESC are critical limitations of their application in clinic. Therefore, the major direction of hESC use is derivation of a specific differentiated progeny, which has lower proliferative potential and immune privilege, yet poses fewer risks. Finally, cell therapy is far more complex and resource-consuming process as compared to drug-based medicine; pluripotent stem cell biology and technology is in need of further investigation and development before these cells can be used in clinics.

Key words: embrional stem cells, induced pluripotent cells, cell therapy.