

образом, только избыточная экспрессия гена *Nanog* обуславливала появление ЭСК-подобных колоний и репрограммирование ядер взрослых клеток. Исследователи заключают, что *Nanog* играет значительную и, возможно, доминирующую роль в репрограммировании ядра взрослой соматической клетки до эмбриональной «стадии плюрипотентности».

Таким образом, авторы впервые чётко определили фактор репрограммирования «взрослого клеточного ядра». Дальнейшая идентификация таких факторов и умение управлять ими может привести к развитию технологии создания собственных ЭСК-подобных клеточных линий без использования эмбрионов, яйцеклеток и технологии переноса ядра.

Ясно, что *Nanog* не единственный «игрок в поле», но, возможно, основной. Уже известно, что плюрипотентное

состояние ЭСК поддерживается взаимодействием основных факторов – Oct3/4, *Nanog*, Sox2 и, возможно, рядом дополнительных [5]. Так Yamanaka Shinya из Kyoto University месяц назад доложил о возможности репрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов до ЭСК-подобного состояния введением комбинации факторов, включающих Sox2 и Oct3/4 [6]. Возможным механизмом репрограммирования и плюрипотентности также могут являться белки (Wnt-3) и молекулы мРНК транскрипционных факторов (Oct-4, Rex-1, *Nanog*, SCL и GATA-2,4), содержащиеся в цитоплазме ЭСК или в мембранных везикулах и поддерживающих «стволовость» [7]. Будущие работы будут направлены на более тщательное изучение этих факторов в человеческих клетках.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rideout W.M. 3rd, Eggan K., Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093–8.
2. Tada M., Takahama Y., Abe K. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 2001; 11: 1553–8.
3. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005; 309: 1369–73.
4. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113: 643–55.

5. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6): 947–56.

6. Shinya Y. Identification of factors that generate ES-like pluripotent cells from fibroblast culture. Oral presentation at 4th ISSR Annual Meeting. June 29 – July 1, 2006, Toronto, Canada.

7. Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847–56.

Подготовил А.В. Берсенева

По материалам *Nature* 2006; 441(7096): 997–1001

Выделение эмбриональных стволовых клеток человека из бластомеров

Стандартный метод выделения эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК) из внутренней клеточной массы бластоцисты вызывает ряд этических противоречий, связанных с разрушением эмбрионов, несмотря на то, что этот материал утилизируется в клиниках искусственного оплодотворения. Чтобы избежать этических проблем, учёные предлагают технологию выделения линий ЭСК из единичных бластомеров на более ранних стадиях развития человеческого эмбриона. Так, в прошлом году группа Lanza из компании Advanced Cell Technology (Worcester, MA, USA) опубликовала работу по выделению линий ЭСК из мышинных бластомеров [1]. Возможность выделения ЭСК человека из эмбрионов более ранних стадий развития (до бластоцисты) была также показана Н. Стрельченко, однако процедура сопровождается разрушением эмбриона [2].

Новая технология – выделение ЭСК из единичных бластомеров позиционируется как метод без разрушения эмбрионов. Техника биопсии бластомера без разрушения эмбриона была отработана уже давно при разработке метода предимплантационной генетической диагностики (PGD) после процедур экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). При этом было показано, что удаление одного бластомера из ранних эмбрионов (до развития стадии бластоцисты) не имеет никакого орицательного влияния на последующее развитие зародыша и ребёнка в будущем [3]. Результаты новой работы группы Lanza, описывающие технику выделения ЭСК из бластомеров человека, опубликованы в он-лайн-версии журнала *Nature*.

Исследователи использовали 16 эмбрионов, замороженных на 8–10-клеточной стадиях в клиниках ЭКО. После

выделения отдельных бластомеров их помещали в среду, оптимальную для культивирования ЭСК. В течение недели исследователи наблюдали деление бластомеров и формирование колоний ЭСК-подобных клеток. Авторам удалось выделить 2 стабильные линии ЭСК. Эти линии демонстрировали все классические признаки плюрипотентности – экспрессировали характерные маркёры, давали тератомы в SCID-мышам, дифференцировались спонтанно или индуцированно в клетки всех 3-х зародышевых листков как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, эти линии по своим характеристикам были практически неотличимы от стандартных зарегистрированных линий ЭСК, выделенных из бластоцист, и даже демонстрировали более выраженные признаки плюрипотентности.

Таким образом, авторы работы показали принципиальную возможность выделения стабильных линий ЭСК человека из единичных бластомеров, полученных из 8–10-клеточных эмбрионов, без их разрушения. Исследователи усовершенствовали технику культивирования бластомеров и индукцию развития из них ЭСК. Более ранние попытки получения ЭСК из бластомеров человека оказывались нереализованными [4, 5].

Несмотря на красивую демонстрацию идеи «выделения ЭСК человека без разрушения эмбрионов», технология не найдёт широкого применения в будущем. Поскольку, как отмечает сам Lanza, она может применяться только у клиентов клиник ЭКО, проходящих процедуру PGD. Однако число таких женщин и семейных пар крайне невелико, и гарантировать женщине – донору яйцеклеток получение собственной линии ЭСК будущего ребёнка можно только при совершенной

технике. Тем не менее, значение работы для научного мира велико, поскольку был реализован совершенно новый подход. Разработанный метод может найти применение при изучении плюрипотентности в эмбриологии, а также для

получении лучших результатов ЭКО в клинической репродуктологии. Компания также рекламирует, что в скором времени учёные получат свободный доступ к выделенным линиям для исследований.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Chung Y., Klimanskaya I., Becker S. et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 2006; 439: 216–9.
2. Strelchenko N., Verlinsky O., Kukharensko V., Verlinsky Y. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004; 9(6): 623–9.
3. Hardy K., Martin K.L., Leese H. et al. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage.

Hum. Reprod. 1990; 5: 708–14.

4. Geber S., Winston R.M.L., Handyside A.H. Proliferation of blastomeres from cleavage stage human embryos in vitro: an alternative to blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 1492–6.

5. Sils E.S., Takeuchi T., Tanaka N. et al. Identification and isolation of embryonic stem cells in reproductive endocrinology: theoretical protocols for conservation of human embryos derived from in vitro fertilization. *Theor. Biol. Med. Model.* 2005; 2: 25.

Подготовил А.В. Берсенов

По материалам *Nature advance online publication 23 August 2006; doi:10.1038/nature05142*

Выделение мультипотентных прогениторных клеток из фетальной печени человека

Трансплантация гепатоцитов или прогениторных клеток печени для лечения печёночной недостаточности является одним из самых востребованных направлений современной регенеративной медицины. Залогом успеха реализации этих подходов является понимание основных ступеней дифференцировки клеток—предшественников в функционирующие гепатоциты в процессе эмбрионального развития, а также их характеристика, выделение и размножение в культуре. У грызунов прогениторные клетки печени присутствуют в каналах Геринга [1, 2] и могут дифференцироваться как в гепатоциты, так и в эпителиальные клетки выстилки желчных протоков, но не способны пролиферировать в ответ на повреждение [3, 4].

К настоящему времени были успешно выделены и довольно хорошо описаны прогениторные клетки из фетальной печени и эпителиальные клетки из печени взрослых грызунов. Suzuki et al. [5] изолировали из фетальной печени мышей клетки с фенотипом $c\text{-met}^+/CD49F^+/CD29^+/CD45^-/CDTER119^-$, которые были способны к дифференцировке в гепатоциты и клетки желчных протоков, а также в эпителиальные клетки поджелудочной железы. Однако выделение мультипотентных клеток из фетальной печени человека и создание их линий гораздо более сложны, и к настоящему времени не было получено постоянной линии таких клеток печени [6].

Недавно группа исследователей из Вашингтонского Университета (Seattle, USA) впервые выделила и описала новую популяцию клеток фетальной печени человека, способных дифференцироваться как в мезенхимальном направлении, так и формировать гепатоциты. Эти клетки были названы фетальными мультипотентными прогениторными клетками печени – hFLMPC (hepatic Fetal Liver Multipotent Progenitor Cells).

hFLMPC были выделены из семи фетальных печеней человека (74–108 дни гестации), после чего поддерживались в первичной культуре в течение трёх месяцев. Далее от них получали клоны, которые культивировались ещё в течение шести месяцев (100 удвоений популяции, 20 пассажей). Фенотипически hFLMPC представляли собой мелкие клетки с небольшим количеством цитоплазмы, экспрессирующие весьма интересный набор маркёров. Так, hFLMPC были

позитивны по CD34, CD90 (thy-1), $c\text{-kit}$ и SSFA-4. Эти маркеры характерны для стволовых клеток крови и присутствуют также на клетках фетальной печени грызунов [7]. Также hFLMPC позитивны по эпителиальным маркерам, таким как EPCAM, CK18 и CK19. CK18 и CK19, являющимися маркерами гепатоцитов и эпителиальных клеток желчных протоков соответственно. Интересно, что hFLMPC также позитивны по мезенхимальным маркерам CD44h и виментину, но негативны по другим характерным для мезенхимы поверхностным молекулам, включая CD105, CD73 и 6SMA. Они негативны по гемопозитическим маркерам CD45 и AC133, позитивны по характерному для гепатоцитов $c\text{-met}$, но не экспрессируют других гепато-специфичных маркеров, таких, как альбумин, $\alpha\text{-фетопозтин}$ и транскрипционных факторов HNF1 α , HNF3 β и HNF4 β . Таким образом, hFLMPC несут смешанный набор мезодермальных и энтодермальных маркеров.

Было установлено, что иммунофенотипические и морфологические характеристики, а также дифференцировочные потенциалы hFLMPC разных пассажей идентичны. Клетки в культурах после первого, пятого и двадцатого пассажей имели одинаковую длину теломеров хромосом и не демонстрировали никаких признаков клеточного старения или «ухода» в апоптоз. Когда исследователи попытались найти в фетальной печени предшественников hFLMPC, пометив различные субпопуляции печёночных клеток флуоресцентным белком GFP, выяснилось, что ни одна из полученных из них колоний hFLMPC не была позитивна по GFP. hFLMPC оказались совершенно независимой популяцией клеток фетальной печени, вряд ли связанной с дедифференцированными паренхимальными гепатоцитами или трансдифференцированными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костного мозга (ММСК). В различных условиях культивирования hFLMPC дифференцировались в гепатоциты и эпителиальные клетки желчных протоков, а также в адипоциты, хондроциты, остеоциты и эндотелиальные клетки, то есть вели себя одновременно как энтодермальные и мезенхимальные предшественники.

Чтобы определить способность hFLMPC функционировать как гепатоциты *in vivo*, их трансплантировали иммунотолерантным мышам. Через тридцать дней от начала эксперимента у