

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., Kukhareno 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. Берсенев

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  $c\text{-met}^+/\text{CD49F}^+/\text{CD29}^+/\text{CD45}^-/\text{CDTER119}^-$ , 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 удвоенный 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  $\beta\text{SMA}$ . 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,  $\alpha\text{-фетопозитин}$  и транскрипционных факторов HNF1 $\alpha$ , HNF3 $\beta$  и HNF4 $\beta$ . 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

всех животных в печени обнаруживался человеческий сывороточный альбумин. На гистологических срезах были видны крупные клетки, позитивные по человеческому альбумину (уровень репопуляции достигал 0,8–1,7%). Эти данные свидетельствуют о том, что hFLMPC могут дифференцироваться в функциональные гепатоциты и интегрироваться в печёночную паренхиму при повреждениях.

Таким образом, морфология, эпителиальные маркеры и способность спонтанно дифференцироваться в гепатоциты отличают hFLMPC от ММСК (в своей работе экспериментаторы использовали ММСК из фетальной печени в качестве контроля и показали, что они не способны давать начало гепатоцитам и эпителиальным клеткам желчных протоков). Они сохраняют свой пролиферативный и дифференцировочный

потенциалы в течение более чем шести месяцев, и развиваются в гепатоциты *in vivo*, что позволяет предполагать в них возможный источник для репопуляции печени при повреждениях органа.

В настоящее время исследователи продолжают работу, изучая критические факторы пролиферации и дифференцировки в различных направлениях, а также оптимальные условия для поддержания культур hFLMPC в течение более долгого времени. Предполагается, что подобные клетки можно получать не только из фетальной печени, но и из фетальной поджелудочной железы и почек. hFLMPC могут стать не только важным терапевтическим средством, но и объектом фундаментальных исследований путей дифференцировки клеток печени.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Fausto N., Campbell J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* 2003; 120: 117–30.
2. Saxena R., Theise N.D., Crawford J.M. Microanatomy of the human liver—exploring the hidden interfaces. *Hepatology* 1999; 30: 1339–46.
3. Solt D.B., Medline A., Farber E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 1977; 88: 595–18.
4. Evarts R.P., Hu Z., Omori N. et al. Precursor-product relationship between

oval cells and hepatocytes: comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2143–51.

5. Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H. In vitro production of functionally mature hepatocytes from prospectively isolated hepatic stem cells. *Cell Transplant.* 2003; 12: 469–73.

6. Tosh D., Strain A. Liver stem cells – prospects for clinical use. *J. Hepatol.* 2005; 42: Suppl S75–S84; 101: 2973–82.

7. Laurson J., Selden C., Hodgson H.J. Hepatocyte progenitors in man and in rodents – multiple pathways, multiple candidates. *Int. J. Exp. Pathol.* 2005; 86: 1–18.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 9912–7

## CD44 – специфичная мишень для селективной элиминации стволовых клеток лейкемии человека

Острый миелолейкоз (ОМЛ) – это злокачественное заболевание, характеризующееся накоплением в организме пациента недифференцированных миелоидных бластов, способных к самообновлению и генерации клоногенных лейкемических клеток-предшественников [1, 2]. Лейкемия-инициирующие или лейкемические стволовые клетки были описаны у человека Bonnet D. и Dick J.E. в 1997 году [3]. В настоящее время термин – «раковые стволовые клетки» (РСК), предложенный этими учёными, признан международной группой экспертов American Association for Cancer Research [4]. Развитие теории РСК может полностью изменить общепринятую концепцию терапии злокачественных опухолей. Современные химиотерапевтические препараты, направленные на элиминацию активно пролиферирующих клеток, вызывают ремиссию заболевания, которая зачастую оказывается обратной. Всего лишь менее 30% подвергшихся такой терапии пациентов выживают в течение долгого времени, что указывает на неэффективность подобного подхода. До сих пор сохраняется необходимость поиска новых терапевтических подходов, способных обеспечить элиминацию РСК, не затрагивая при этом нормальных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [5].

РСК при ОМЛ во многом схожи с ГСК, включая поверхностный фенотип CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, но при этом они способны к ускоренному самообновлению и могут экспрессировать на своей мембране ряд специфических маркеров. Одним из таких маркеров является молекула адгезии CD44, ответственная за хоуминг и энграфтинг лейкемических бластов [6]. CD44 обеспечивает взаимодействие малигнизированных клеток с их микроокружением в костном мозге и,

по-видимому, препятствует их дифференцировке. Известно, что CD44 – это трансмембранный гликопротеин, экспрессируемый многими клетками крови и в ходе своей продукции подвергающийся альтернативному сплайсингу с образованием различных изоформ (CD44v) [7]. Повышенная экспрессия этих изоформ, в особенности – изоформы CD44-6v, отмечается при остром миелолейкозе, и свидетельствует о плохом прогнозе заболевания [8].

Исследовательская группа под руководством John Dick предположила, что связывание образовавшейся в результате альтернативного сплайсинга изоформы CD44v специфическими антителами может селективно воздействовать на РСК, но не затрагивать ГСК. Результаты экспериментов по испытанию таких специфических антител – Н90 опубликованы в журнале *Nature Medicine*.

Обнаружилось, что Н90, специфически связывая CD44v, характерный для ОМЛ, препятствует развитию заболевания у иммунодефицитных мышей, получивших инфузию человеческих лейкемических бластов. Также введение Н90 приводило к регрессии уже развившихся опухолей. Исследователи доказали, что применение Н90 безопасно и не воздействует на нормальные гемопоэтические клетки. Контрольный трансплантат ГСК практически не реагировал на введение в организм реципиента специфических антител к CD44, а снижение количества донорских ГСК было минимальным по сравнению с зачастую полной элиминацией РСК.

Было показано, что CD44 является ключевым регулятором, необходимым для хоуминга стволовых клеток опухоли и их дальнейшего поддержания в недифференцированном