

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© Н. Н. Никольский,¹ И. А. Габай, Н. В. Сомова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
¹ *электронный адрес: Nikolsky@mail.cytspb.rssi.ru*

Получение постоянных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека было отнесено к одному из наиболее значительных достижений биологии XX в. и приобрело широкий научный и общественный резонанс, поскольку ЭСК можно рассматривать в перспективе как неограниченный источник трансплантационного материала для заместительной клеточной терапии. К настоящему времени линии ЭСК получены более чем в 20 странах. В нашей стране исследования ЭСК человека проводятся в Институте цитологии РАН и Институте биологии гена РАН. Линии ЭСК получают путем перевода в культуру клеток внутренней массы преимплантационных бластоцист человека, используемых для процедуры экстракорпорального оплодотворения. Работы, проводимые с ЭСК человека, можно разделить на несколько направлений. Одним из основных является разработка наиболее оптимальных методов культивирования ЭСК, связанных в первую очередь с подбором условий, исключающих использование фидерных клеток животных и других компонентов животного происхождения. Другое направление заключается в массовом анализе экспрессии генов, специфичных для эмбрионального состояния клеток и соответствующих сигнальных путей. Большое количество исследований с ЭСК человека сосредоточено на подборе условий, обеспечивающих направленную дифференцировку ЭСК в различные тканеспецифические клетки. Показано, что в условиях *in vitro* ЭСК могут дифференцироваться практически в любые соматические клетки. Большое значение имеют работы, направленные на разработку метода «терапевтического клонирования», т. е. осуществления переноса и реактивации соматических ядер в энуклеированных яйцеклетках или цитобластах ЭСК. Исключительно важное значение для ЭСК человека приобретает проблема стандартизации. При этом требования и набор стандартных показателей для клеток, предназначенных для исследовательских или терапевтических целей, могут быть различными. Необходима периодическая проверка генетической стабильности линий, поскольку оказалось, что по мере длительного культивирования ЭСК многие «постоянные» линии претерпевают генетические и эпигенетические изменения. Основной целью настоящего обзора является более подробное рассмотрение работ, посвященных анализу генетической стабильности линий ЭСК человека и ЭСК мыши. Линии ЭСК, полученные как за рубежом, так и в нашей стране, пока не могут быть использованы в клинической практике. Наиболее вероятно, что в терапевтических целях непосредственно недифференцированные ЭСК не будут применяться из-за опасности их злокачественного перерождения. Поэтому основные усилия должны быть направлены на получение на основе ЭСК прогениторных и высокодифференцированных клеток, пригодных для трансплантации.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки человека, эмбриональные стволовые клетки мыши, постоянные линии ЭСК человека, генетическая стабильность.

Краткий исторический экскурс

Первые постоянные линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека были получены в США в 1998 г. (Thomson et al., 1998). Эта работа была отнесена к одному из наиболее крупных достижений биологии прошедшего XX в. Хотя еще в 1981 г. были получены постоянные линии ЭСК мыши (Evans, Kaufman, 1981), эти работы развивались в спокойном академическом русле и не привлекали к себе пристального и активного внимания как научной общественности, так и средств массовой информации. Однако постепенно получение постоянных линий ЭСК человека породило много как этических, так и политических вопросов. С одной стороны, работы с ЭСК человека открыли широкие перспективы

их использования в так называемой заместительной клеточно-тканевой терапии, восстановительной медицине, для лечения различных тяжелых повреждений органов и тканей. С другой стороны, эти исследования затронули целый ряд этических вопросов, связанных как с пониманием существа самых ранних этапов развития человека, так и с различными религиозными мотивами. Дело в том, что ЭСК получают из внутриклеточной массы бластоцист, т. е. используют материал с той стадии развития, когда эмбриональная клетка уже превращается в некое образование, называемое бластоцистой, состоящее приблизительно из сотни клеток.

Работы с бластоцистами человека стали доступны после внедрения в медицинскую практику метода экстракорпорального оплодотворения. При использовании

этого метода всегда остаются бластоцисты, которые не употребляются для подсадки в организм женщины и уничтожаются либо сохраняются в замороженном виде в жидком азоте. Поэтому появилась возможность использовать эти так называемые экстрабластоцисты для научных целей, и в частности, для получения из них постоянных линий ЭСК человека. Используют также донорские яйцеклетки после их искусственного оплодотворения.

Сложилась ситуация, когда сам метод экстракорпорального оплодотворения, замораживания бластоцист и даже их уничтожения как ненужного материала не вызывал критики и был признан католической церковью. Однако возможность использования тех же самых бластоцист вместо их заморозки и уничтожения для научных целей вызвала волну этических споров и возражений со стороны католической церкви, а также стала полем для политических споров. Так, в 2002 г. президент США Дж. Буш выступил с предложением запретить государственное финансирование работ по получению новых стволовых клеток из бластоцист человека, считая, что при этом уничтожается возможная будущая жизнь. Но поскольку к этому времени уже было получено достаточное количество постоянных линий ЭСК как в США, так и в других государствах, Национальный институт здоровья США (NIH) разрешил использовать определенный набор из 11 линий ЭСК человека для научных исследований. И именно для широкого исследования этих уже полученных ранее линий президент США предложил выделить 250 млн долларов. Предполагалось, что эти финансовые средства должны быть использованы для научной работы, для подготовки кадров, умеющих работать с данными линиями ЭСК человека, для привлечения в эту область ученых из смежных областей. Все это свидетельствовало о том, что значимость и перспективность исследовательской работы с ЭСК человека признавались, в том числе и администрацией президента США. Законом также не запрещалось использовать для получения новых линий ЭСК частный капитал или бюджетные средства тех же американских штатов, если не было законов на уровне штатов, запрещающих эту деятельность. Например, в Калифорнии была предложена собственная программа развития работ по получению и исследованию ЭСК человека.

Естественно, что такое пристальное внимание к проблеме ЭСК человека вызвало и широкую волну обсуждения этих проблем в средствах массовой информации, и всплеск общественного интереса к этой проблеме. Такого интереса и жарких дискуссий вокруг данной проблемы, конечно, не было бы, если бы дело заключалось только в этических вопросах. Но основной интерес и основное внимание к линиям ЭСК человека связаны с перспективами их клинического использования. Из первых работ с ЭСК человека фактически следовало, что можно получить клеточный материал, способный к бесконечному размножению и состоящий из клеток с одинаковыми свойствами и одинаковой способностью к дифференцировке в тканеспецифические клетки, в том числе и в генеративные.

Как всегда бывает в таких случаях, в обществе возникли требования и желания быстрого использования ЭСК и неоправданная вера в их чудодейственные свойства. На волне повышенного интереса и сверхожиданий создавались частные компании, делающие ставку на использование ЭСК человека в целях лечения различных

заболеваний и тяжелых травм человека. Коммерциализация таких компаний вначале росла очень быстро, но когда выяснилось, что практический выход не столь очевиден, стоимость акций этих компаний резко пошла вниз и сохранилась в настоящее время на некотором рациональном уровне.

К настоящему времени не было еще заявлено ни об одном случае клинического использования клеток, полученных из ЭСК человека. Но рядом компаний анонсируется возможность в самое ближайшее время предоставить для клиники нейроны, полученные из ЭСК человека, для лечения травм спинного мозга, а также клетки, производящие инсулин, для лечения диабета. Недавно был опубликован обзор состояния работ в области ЭСК человека, основанный на библиографических и иных информационных данных (Guhr et al., 2006). В 2006 г. собственные линии ЭСК человека имели уже более 20 стран. Среди них — США, Великобритания, Япония, Израиль, Россия, Сингапур, Австралия, Китай, Корея, Швеция, Чехия, Испания, Иран, Нидерланды, Турция, Дания, Финляндия и другие страны (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000; Amit, Itskovitz-Eldor, 2002; Zeng et al., 2004; Findikli et al., 2005; Li et al., 2005; Oh et al., 2005; Simon et al., 2005; Skottman et al., 2005; Van de Stolpe et al., 2005; Baharvand et al., 2006; Heins et al., 2006; Lysdahl et al., 2006; Ware et al., 2006). Всего по официальным источникам, полученным по разным каналам информации, в мире насчитывается 414 культур ЭСК человека. При этом, несмотря на запрещение финансирования работ по получению новых линий ЭСК из американского государственного бюджета, именно США лидируют по общему числу линий ЭСК человека. Только в Институте репродуктивной генетики, возглавляемом Ю. С. Верлинским (г. Чикаго), к началу 2006 г. насчитывалось 144 культуры ЭСК человека, полученные как от здоровых людей, так и от пациентов с генетическими (наследственными) заболеваниями (Verlinsky et al., 2005). Большинство этих культур не доведено до стадии полностью охарактеризованных линий.

Количество полностью охарактеризованных линий, сведения о которых опубликованы в ведущих научных журналах, приблизилось в США в 2006 г. к 40, хотя рекомендации NIH распространяются только на 22 линии. Среди этих линий и первый клональный вариант — линия H9 (Amit et al., 2000), которая наиболее часто передавалась для использования в различные лаборатории, в том числе и за пределы США. Общее количество работ, в которых была использована эта линия, достигло 110. Общее число работ по получению и исследованию ЭСК быстро росло и к началу 2006 г. достигло 315. Из них более 70 % работ было выполнено на ЭСК, полученных группой Томсона (Guhr et al., 2006) и рекомендованных NIH, хотя на долю американских авторов из них приходится менее 50 %. Очень активно в области ЭСК человека работают ученые Израиля, Англии, Южной Кореи, Швеции и Китая.

Опыт Института цитологии РАН свидетельствует о том, что перевод ЭСК в культуру еще не означает, что из этих клеток будут получены линии. Сотрудниками Института цитологии РАН опубликованы две работы о получении 5 линий ЭСК человека, хотя и не полностью охарактеризованных (Крылова и др., 2003, 2005). В упомянутом выше обзоре (Guhr et al., 2006) указывается, что в России имеется 8 линий ЭСК. Кроме Института цитологии РАН линии ЭСК человека были получены в Ин-

ституте биологии гена РАН (Крылова и др., 2003; Прыжкова и др., 2004; Гордеева и др., 2006; Lagarkova et al., 2006).

Получение ЭСК и проблемы культивирования

В основе метода получения постоянных линий ЭСК человека лежит методика извлечения клеток из внутренней клеточной массы и перевод этих клеток в культуру. Как правило, используются 4- и 5-суточные бластоцисты, хотя описаны попытки доразивания бластоцист и до 9-суточного возраста в целях получения большего количества внутриклеточной массы (Fong et al., 2004). Однако это направление не получило широкого развития. Описан также метод получения ЭСК из морулы (Strelchenko, Verlinsky, 2006). Наконец, совсем недавно появилась уникальная работа о получении линии ЭСК из одиночного бластомера, т. е. оказывается принципиально возможным получение линии с сохранением жизнеспособной бластоцисты (Klimanskaya et al., 2006).

После извлечения внутренней клеточной массы из бластоцисты ЭСК переносятся на фидерный слой, обеспечивающий их дальнейшее размножение. Принципиальной проблемой подбора фидерного слоя является создание таких условий, которые способствовали бы поддержанию эмбрионального состояния стволовых клеток и тормозили бы переход их к дифференцировке. Фидерный слой поставляет в среду некие факторы для роста и поддержания самообновления ЭСК. По аналогии с культивированием ЭСК мыши, для которых основным фактором, поддерживающим недифференцированное состояние ЭСК, оказался фактор LIF (leukemia inhibitory factor), для культивирования ЭСК человека в первых работах с ЭСК человека использовали также LIF, но не мыши, а человека. Однако последующие исследования показали, что LIF не является обязательным фактором и не вызывает в культуре ЭСК человека активацию сигнального пути, зависящего от STAT3, как в ЭСК мыши (Humphrey et al., 2004).

В качестве фидерного слоя наиболее часто используют эмбриональные фибробласты мыши. Имеются работы, в которых использовали трансформированные фибробласты мыши линии STO (Park et al., 2003). Клетки этой линии использовались также и в наших исследованиях (Крылова и др., 2003).

Естественно, были предприняты попытки для перевода клеток человека с мышинного фидера на фидерные клетки человека. Оказалось, что возможно культивирование клеток и получение новых линий, применяя в качестве фидерного слоя фибробласты крайней плотности человека (Amit et al., 2003; Inzunza et al., 2005). В одной из работ (Richards et al., 2002) были протестированы в качестве фидерного слоя 11 различных культур фибробластов человека и в результате были выбраны только 2 культуры, обеспечивающие наиболее оптимальный рост ЭСК с сохранением плюропотентности и стабильного кариотипа.

В качестве фидерного слоя можно использовать мезенхимные клетки костного мозга или культуру фибробластов, полученную из этих клеток, а также клетки эндометрия человека (Lee et al., 2004).

В Институте цитологии РАН для поддержания культуры ЭСК человека использовались культуры клеток

STO, эмбриональные фибробласты мыши, фибробласты человека и мезенхимные клетки костного мозга. Наиболее принципиальной проблемой при выборе фидерного слоя является вопрос о том, какие факторы секреторируются фидерным слоем и какова роль тех контактов, которые осуществляются между ЭСК, полученными из бластоцисты, и клетками данного фидерного слоя. Окончательного ответа на этот вопрос пока не существует.

Попытки подобрать полностью синтетическую среду без использования фидерного слоя, т. е. подобрать аналог кондиционированной среды, привели к тому, что удалось вести некоторые культуры ЭСК с сохранением эмбриональных свойств в условиях без фидера и без добавления эмбриональной сыворотки (Amit et al., 2004; Simon et al., 2005; Ellerstrom et al., 2006; Mallon et al., 2006). В качестве подложки в этих экспериментах использовался матригель, т. е. некий набор экстраклеточных белков (Xu et al., 2001). В качестве компонентов среды, наиболее существенных для замены факторов кондиционной среды, использовали такие добавки, как фактор роста фибробластов bFGF, трансформирующий фактор роста TGF β 1 и активин (Xiao et al., 2006). Вопрос о том, какую роль в поддержании эмбрионального статуса культуры играет каждый из перечисленных выше факторов и каковы сигнальные пути, запускаемые этими факторами, требует дальнейших исследований.

Тем не менее появилось уже сообщение о получении линии или во всяком случае культуры ЭСК человека без использования фидерного слоя и в среде без добавления каких-либо компонентов животного происхождения, т. е. в полностью идентифицированных условиях (Ludwig et al., 2006). Надо надеяться, что эти исследования получат дальнейшее подтверждение и развитие.

Основные направления работы с ЭСК человеком

Работы, проводимые в настоящее время с ЭСК человека, можно разделить на несколько основных групп. Продолжаются работы по отработке наиболее оптимальных методов культивирования ЭСК, связанных в первую очередь с подбором условий культивирования, исключающих использование фидерных клеток животных и других компонентов животного происхождения, о чем было сказано выше. Эти работы сосредоточены на поиске наиболее оптимального состава белков экстраклеточного матрикса и внесения в состав среды новых компонентов. Попытки поиска компонентов, обуславливающих поддержание эмбрионального статуса клеток, путем анализа кондиционированной среды успеха пока не имели.

Важнейшим направлением работ с ЭСК является массовый анализ экспрессии генов, специфичных для эмбриональных клеток (Sato et al., 2003; Bhattacharya et al., 2004; Li et al., 2006), и соответственно выявление внутриклеточных сигнальных путей (Carpenter et al., 2004; Avery et al., 2006; Wang et al., 2006). Кроме уже известных маркеров ЭСК человека, таких как Oct-4, NANOG, SSEA-4 и некоторых других поверхностных антигенов, эти работы пока еще не выявили стандартного (эмбрионального) набора экспрессируемых генов. В связи с этим интересно отметить, что японским авторам удалось совсем недавно репрограммировать фибробласты мыши и придать им эмбриональный статус за счет оверэкспрессии только четы-

рех генов: *oct-4*, *sox-2*, *c-myc* и *klf-4* (Takahashi, Yamanaka, 2006). Однако вряд ли можно полагать, что именно экспрессия этих генов достаточна для поддержания эмбриональных свойств у стволовых клеток.

Большое количество исследований с ЭСК человека сосредоточено на подборе условий, обеспечивающих направленную дифференцировку ЭСК в различные тканеспецифичные клетки. Показано, что в условиях *in vitro* ЭСК могут дифференцироваться практически в любые типы соматических клеток (Odorico et al., 2001; Schuldiner, Benvenisty, 2003; Conley et al., 2004). Особенно много работ, показывающих способность ЭСК дифференцироваться в кардиомиоциты или в допаминергические нейроны. Понятно, что последние работы нацелены в перспективе на возможность применения таких клеток для лечения болезни Паркинсона (Ben-Nur et al., 2004).

Очень большое значение имеют работы, направленные на разработку так называемого терапевтического клонирования — метода, при котором осуществляются перенос и реактивация соматических ядер в энуклеированные яйцеклетки или цитобласты ЭСК. К сожалению, это важное направление было омрачено скандальной публикацией фальсифицированных данных (Hwang et al., 2004). На фоне этого широко обсуждаемого скандала осталась в тени более ранняя публикация китайских авторов, в которой описывались реактивация соматических ядер человека, перенесенных в энуклеированные яйцеклетки кролика, развитие из таких яйцеклеток бластоцист и получение из них культур ЭСК, характеризующихся нормальным диплоидным набором хромосом человека (Chen et al., 2003). Что касается реактивации соматических ядер за счет слияния с ЭСК человека, то ее удавалось наблюдать пока только в тетраплоидных клетках (Cowan et al., 2005; Strelchenko et al., 2006).

Проблема стабильности линий ЭСК

При работе с любыми клеточными линиями всегда возникает вопрос о стандартизации, о правомочности сравнения данных, полученных на одной и той же линии, но в разных лабораториях. Для ЭСК человека проблема стандартизации приобретает исключительно большое значение из-за перспективы их использования в клинике. При этом требования и набор стандартных показателей для клеток, предназначенных для исследовательских или терапевтических целей, могут быть различными.

С 2004 г. стоит вопрос о том, что такое постоянная линия ЭСК, сколь неизменны ее свойства. Оказалось, что в течение длительного культивирования многие «постоянные» линии ЭСК претерпевают генетические и эпигенетические изменения. Эта проблема имеет кардинальное значение, и одной из целей настоящего обзора является более подробное рассмотрение работ, посвященных этому вопросу. Первое подобное сообщение из лаборатории Дж. Томсона об изменении кариотипа при длительном пассировании 3 линий ЭСК появилось в 2004 г. (Draper et al., 2004), т. е. только через 6 лет после первой публикации о получении постоянных линий (Thomson et al., 1998). В том же 2004 г. была опубликована работа группы Мелтона, авторы которой получили 17 линий ЭСК (Cowan et al., 2004b). На ранних пассажах (до 22-го) 15 линий сохраняли диплоидный кариотип, и только 2 линии имели инверсии. На поздних пассажах

(с 29-го по 34-й) еще в 4 линиях появились кариотипические изменения, трисомия по 12-й хромосоме и инверсия 2q.

Наиболее обстоятельное исследование генетической и эпигенетической изменчивости 9 постоянных линий ЭСК, взятых из различных лабораторий, было опубликовано в 2005 г. (Maitra et al., 2005). Была изучена геномная стабильность линий на ранних (с 11-го по 59-й) и поздних (с 30-го по 175-й) пассажах. Критериями геномной стабильности были выбраны число копий ядерной ДНК (плоидность, но не кариологический анализ), последовательность митохондриальной ДНК и метилирование 14 генных промоторов. В 4 линиях на поздних пассажах были обнаружены ампликации и делеции, в разных линиях разные, но все они затрагивали участки хромосом 17, 18 и 20, которые часто изменяются в раковых клетках. В 5 линиях хромосомных изменений не наблюдали. Изменения митохондриальной ДНК были обнаружены в 2 линиях: мутации в последовательностях, кодирующих NADH-дегидрогеназу и АТФазу. Для исследования статуса метилирования промоторов были выбраны 14 генов, у которых меняется метилирование при канцерогенезе. Характер метилирования 3 генов менялся на поздних пассажах в 2 линиях. В 7 линиях наблюдали усиление метилирования гена RASSF1 (супрессорный ген, локализованный для раковых клеток). Характер метилирования по всем изученным генам менялся в 8 из 9 линий. В итоге только 1 линия — SA001 (Cellartis AB), исследованная на 14-м и 60-м пассажах, не имела изменений. Таким образом, подавляющее большинство линий ЭСК при длительном культивировании генетически нестабильно. Авторы подчеркивают, что их исследование было направлено на выяснение причин этой нестабильности и ее функциональных последствий, но, учитывая энтузиазм в применении линий ЭСК в клинике, полагают, что в ближайшем будущем причины нестабильности будут активно исследоваться (Maitra et al., 2005). Авторы обратили внимание на то, что аномалии по числу хромосомных копий чаще наблюдались в линиях, культивируемых без фидера и пассируемых ферментативно (в 3 из 5), и меньше в линиях, культивируемых на фидере и пассируемых механически (1 из 4). Правда, характер метилирования промоторов такой корреляции не выявил. Противоречия в литературе относительно генетической стабильности линий ЭСК при длительном культивировании могут объясняться методами ее оценки. Несмотря на выявленные генетические изменения в линиях ЭСК на поздних пассажах, авторы считают, что на ранних пассажах эти клетки вполне пригодны для терапевтического применения, но подчеркивают необходимость постоянного мониторинга. Авторы полагают, что из-за генетических изменений на поздних пассажах клетки линий, бюджетная поддержка которых разрешена правительством США, могут вскоре исчерпать свой физический ресурс (Maitra et al., 2005).

Справедливость последнего замечания хорошо иллюстрируется в специальном исследовании 15 из 22 линий ЭСК человека, взятых из числа рекомендованных NIH и разрешенных для финансовой поддержки из федерального бюджета США (Ware et al., 2006). Оказалось, что только 9 линий из 15 полностью отвечали требованиям к ЭСК человека. Однако при длительном пассировании первоначальный диплоидный кариотип этих линий претерпевал изменения, т. е. все эти линии были пригодны для работы только на ранних пассажах.

К настоящему времени хромосомные изменения, в том числе трисомия, при длительном культивировании ЭСК описаны многими авторами. При этом наиболее часто встречается трисомия по хромосомам 12 и 17 (Cowan et al., 2004a, 2004b; Draper et al., 2004; Maitra et al., 2005; Mitalipova et al., 2005). Кроме того, описаны случаи трисомии по хромосоме 20 (Rosler et al., 2004), хромосоме 13 (Heins et al., 2004; Caisander et al., 2005) и хромосоме 16 (Suemori et al., 2006). Выдвигается предположение о том, что эти изменения могут быть сопряжены с участием генов, содержащихся в этих хромосомах, в процессах, обеспечивающих клеткам преимущество в росте в культуре.

Достаточно часто при длительном культивировании ЭСК наблюдаются изменения X-хромосомы, в том числе инактивация (Inzunza et al., 2004; Hoffman et al., 2005).

В то же время другие ученые, напротив, отмечали стабильность кариотипа ЭСК в течение 2 лет культивирования (Richards et al., 2002; Brimble et al., 2004; Buzard et al., 2004; Rosler et al., 2004).

О генетической стабильности ЭСК говорят результаты исследований группы шведских ученых (Caisander et al., 2005; Hanson, Caisander, 2005). Авторами утверждается, что их линии, пересеваемые механическим путем и поддерживаемые в течение длительного периода (35 мес), а также прошедшие процедуру замораживания—размораживания, сохраняют стабильный кариотип. Из 5 линий, исследованных шведскими авторами, только 1 имела измененный кариотип — трисомию по хромосоме 13. Любопытно, что трисомия не приводила к изменению скорости делений по сравнению с клетками, обладающими нормальным кариотипом. Авторы обращают внимание на возможность появления изохромосом как результат нерасхождения хромосом в митозе, возникновения соответствующей трисомии и последующего уменьшения числа копий до двух. Таким образом, происходит потеря гетерозиготности. Нужно подчеркнуть, что именно шведская линия SA001 была отмечена как единственная стабильная линия в независимом исследовании, цитируемом выше (Maitra et al., 2005). Но, как справедливо отмечают авторы этой работы, подобный разброс результатов может быть связан с низкой «разрешающей способностью метода», а следовательно, субмикроскопические перестройки могут быть пропущены при анализе, а впоследствии стать причиной более крупных хромосомных изменений.

Нестабильность кариотипа, возникающая в процессе длительного культивирования ЭСК мыши, отмечалась многими авторами. В связи с этим не совсем понятно практически полное отсутствие обсуждения этой проблемы и результатов, полученных в работах с ЭСК мыши, в первоначальных публикациях, посвященных ЭСК человека. Возможно, одной из причин, побуждающих авторов работ с линиями ЭСК человека надеяться на их длительную стабильность, был давно известный факт, свидетельствующий о том, что способность к спонтанной трансформации клеток грызунов намного выше, чем клеток человека (Ginis et al., 2004). Действительно, у соматических нестволовых клеток человека, в том числе и эмбриональных, например фибробластов, спонтанной трансформации практически никогда не наблюдали в отличие от клеток мыши.

Генетическую нестабильность ЭСК мыши наблюдали во многих работах. Простой анализ числа ДНК ЭСК мыши в процессе длительного культивирования показал,

что доля эуплоидных клеток уменьшается с ростом номера пассажа (Миталипов и др., 1994). Так, если на 17-м пассаже количество нормальных метафазных пластинок составило 82 % от общего числа, то на 42-м эуплоидных клеток было уже 58 %.

Ряд авторов проводили исследования структуры хромосом с помощью различных методов, таких как стандартное окрашивание на G-диски и многоцветовая FISH-гибридизация (Jentsch et al., 2003; Guo et al., 2005). Наиболее часто обнаруживались такие изменения, как трисомия по хромосомам 8, 11, 12, 14 и 15 и Робертсоновские транслокации (Liu et al., 1997; Park et al., 1998; Глазко и др., 2005; Guo et al., 2005). Интересно, что была обнаружена обратная корреляция между эффективностью включения ЭСК в линию половых клеток и скоростью роста колоний ЭСК (Liu et al., 1997). Наибольшее количество нарушений, среди которых утеря Y-хромосомы (кариотип XO), транслокации хромосомы 12 на Y-хромосому, трисомии по хромосомам 11, 6, 7, 8, 12 и 15, встречалось в клонах большого размера, в то время как в малых клонах доля эуплоидных клеток достигала 100 %.

Наблюдаемая трисомия по отдельным хромосомам многими авторами связывается с тем фактом, что хромосома 8 (Park et al., 1998; Глазко и др., 2005), так же как и хромосома 11 (Iles, Evans, 1977; Crolla et al., 1990; Raz et al., 1999), содержит в своем составе гены, ответственные за передачу сигнала от фактора LIF (Kishimoto, 1994; Hirano et al., 1997, 2000). Более того, в этих же хромосомах есть гены, контролирующее нормальное прохождение клеткой митоза (Ko et al., 2000; Uhlmann, 2001). Таким образом, отбор клеток с селективным преимуществом может привести к нарушению нормального протекания митоза и появлению дальнейших изменений кариотипа.

Существенным преимуществом исследований на ЭСК мыши является возможность проверки сохранения эмбрионального статуса клеток путем создания химерных бластоцист и соответственно химерных организмов. Так, в результате исследований по получению химерных мышей путем гибридизации ЭСК с тетраплоидными зародышами на ранних стадиях развития (4 бластомера) было установлено, что лишь ЭСК, взятые на ранних пассажах (с 6-го по 14-й), были способны при слиянии с зародышем давать взрослую фертильную особь (Nagy et al., 1993). Подсчет количества хромосом на пассажах 11 и 33 не выявил значительных отклонений от нормы ни в том, ни в другом случае. Было также показано, что клетки ранних пассажей превосходят клетки поздних пассажей по доле химер среди потомства (Миталипов и др., 1994). На этом основании было сделано заключение о том, что кариотипические изменения отражаются на способности клеток включаться в бластоцисту и давать химеры. По-видимому, одним из первых проявлений изменения свойств ЭСК в процессе их культивирования является потеря способности к дифференцировке в клетки генеративного ряда (Suzuki et al., 1997). Любопытно, что ни в одной из приведенных работ не отмечалось какого-либо изменения внешней морфологии клеток при культивировании.

Заключение

Сравнение данных, полученных на ЭСК человека и ЭСК мыши, показывает, что при длительном культивировании характер кариотипических изменений сходен.

Различие состоит лишь в том, что в культурах ЭСК мыши изменения найдены на более ранних пассажах. Поэтому можно полагать, что закономерности, полученные в экспериментах с химерными мышами, должны распространяться и на ЭСК человека, с которыми такие эксперименты проводить невозможно.

Обнаружение генетической нестабильности линий ЭСК человека в процессе длительного культивирования свидетельствует о необходимости преимущественного использования клеток ранних пассажей. Понятно, что при такой ситуации нельзя рассчитывать на работу с некоторым ограниченным количеством линий ЭСК, как это первоначально было рекомендовано администрацией США. Необходимо получение новых линий ЭСК человека, включение в эти исследования новых коллективов и новых стран, что и происходит в действительности. В перспективе, вероятно, будут создаваться Банки ЭСК человека, характеризующиеся различными генетическими и иммунологическими свойствами. Будет производиться стандартизация линий ЭСК. При этом во многих экспериментальных работах, вероятно, будет допустимо использование линий с измененным кариотипом, но сохраняющих свойство плюрипотентности, как это наблюдается во многих экспериментальных работах на ЭСК мыши.

Несмотря на то, что надежды на быстрое клиническое использование ЭСК человека не оправдались, не вызывает сомнений перспектива получения на их основе различного трансплантационного материала. Наиболее вероятно, что в терапевтических целях непосредственно недифференцированные ЭСК не будут применяться из-за опасности их злокачественного перерождения.

Предстоит достаточно длительная и кропотливая работа по подбору условий дифференцировки ЭСК в соответствующих «нишах», близких по своему составу к естественным условиям организма человека на стадии эмбрионального развития. Можно надеяться, что в конце концов будут подобраны условия, позволяющие использовать весь потенциал ЭСК, обеспечивающий нормальное развитие человеческого организма.

Список литературы

Глазко Т. Т., Межевкина Л. М., Бойко А. А., Фесенко Е. Е. 2005. «Цепная» кариотипическая эволюция эмбриональных стволовых клеток линии R1 *in vitro*. Цитология. 47 (8) : 679—685.

Гордеева О. Ф., Красникова Н. Ю., Ларионова А. В., Крылова Т. А., Полянская Г. Г., Зиновьева Р. Д., Гуляев Д. В., Прыжкова Д. В., академик Никольский Н. Н., академик Хрущев Н. Г. 2006. Анализ экспрессии генов, специфических для плюрипотентных и первичных половых клеток, в линиях эмбриональных стволовых клеток человека и мыши. Докл. РАН. 406 : 835—839.

Крылова Т. А., Зенин В. В., Михайлова Н. А., Пинаев Г. П., Никольский Н. Н., Полянская Г. Г. 2005. Постоянные линии эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 47 (1) : 121—130.

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. Получение и характеристика постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 45 (12) : 1172—1177.

Миталипов Ш. М., Миталипова М. М., Иванов В. И. 1994. Влияние длительности культивирования на плюрипотентность эмбриональных стволовых (ES) клеток мыши *in vitro* и *in vivo*. Онтогенез. 25 (6) : 19—26.

Прыжкова М. В., Лагарькова М. А., Лякишева А. В., Ревазова Е. С., Гнучев Н. В., Киселев С. Л. 2004. Получение линий эмбриональных стволовых клеток человека, их анализ и характеристика по специфическим маркерам. Информ. бюл. «Клеточные культуры». 19 : 22—25.

Amit M., Carpenter M. K., Inokuma M. S., Chiu C. P., Harris C. P., Waknitz M. A., Itskovitz-Eldor J., Thomson J. A. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Develop. Biol.* 227 : 271—278.

Amit M., Itskovitz-Eldor J. 2002. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J. Anat.* 200 : 225—232.

Amit M., Margulets V., Segev H., Shariki K., Laevsky I., Coleman R., Itskovitz-Eldor J. 2003. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 68 : 2150—2156.

Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J. 2004. Feeder and serum free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70 : 837—845.

Avery S., Inniss K., Moore H. 2006. The regulatory of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells Develop.* 15 : 729—740.

Boharvand H., Ashtiani S. K., Taeae A., Massumi M., Valojerdi M. R., Yazdi P. E., Moradi S. Z., Farrokhi A. 2006. Generation of new human embryonic stem cell lines with diploid and triploid karyotypes. *Develop. Growth Differ.* 48 : 117—128.

Ben-Hur T., Idelson M., Khaner H., Pera M., Reinhartz E., Itzik A., Reubinoff B. E. 2004. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells.* 22 : 1246—1255.

Bhattacharya B., Miura T., Brandenberger R., Mejido J., Luo Y., Yang A. X., Joshi B. H., Ginis I., Thies R. S., Amit M., Lyons I., Condie B. G., Itskovitz-Eldor J., Rao M. S., Puri R. K. 2004. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood.* 103 : 2956—2964.

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. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sapling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Develop.* 13 : 585—597.

Buzzard J. J., Gough N. M., Crook J. M., Colman A. 2004. Karyotype of human ES cell during extended culture. *Nat. Biotechnol.* 22 : 381—382.

Caisander G., Park H., Frej K., Lindqvist J., Bergh C., Lundin K., Hanson C. 2005. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines prolonged *in vitro* culture. *Chromosome Res.* 14 : 131—137.

Carpenter M. K., Rosler E., Fisk G. J., Brandenberger R., Ares X., Miura T., Lucero M., Rao M. S. 2004. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Develop. Dyn.* 229 : 243—258.

Chen Y., He Z. X., Liu A., Wang K., Mao W. W., Chu J. X., Lu Y., Fang Z. F., Shi Y. T., Yang Q. Z., Chen D. Y., Wang M. K., Li J. S., Huang S. L., Kong X. Y., Shi Y. Z., Wang Z. Q., Xia J. H., Long Z. G., Xue Z. G., Ding W. X., Sheng H. Z. 2003. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Res.* 13 : 251—264.

Conley B. J., Young J. C., Trounson A. O., Mollard R. 2004. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 : 555—567.

Cowan C. A., Atienza J., Melton D. A., Eggan K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science.* 309 : 1369—1373.

Cowan C. A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J. P. 2004a. Derivation of embryonic stem cells lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* 350 : 1275—1276.

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. 2004b. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* 350 : 1353—1356.

- Crolla J. A., Brown D., Whittingham D. G. 1990. Spontaneous induction of an homologous robertsonian translocation, Rb(11.11) in a murine embryonic stem cell line. *Genet. Res.* 55 : 107—110.
- 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. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22 : 53—54.
- Ellerstrom C., Strehl R., Moya K., Andersson K., Bergh C., Lundin K., Hyllner J., Semb H. 2006. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells.* 24 : 2170—2176.
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature.* 292 : 154—156.
- Findikli N., Kahraman S., Akcin O., Sertyel S., Candan Z. 2005. Establishment and characterization of new human embryonic stem cell lines. *Reprod. Biomed. Online.* 10 : 617—627.
- Fong C. Y., Sathananthan A. H., Wong P. C., Bogso A. 2004. Nine-day-old human embryo cultured *in vitro*: a clue to the origins of embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online.* 9 : 321—325.
- Forsyth N. R., Musio A., Vezzoni P. A., Hamish R. W., Simpson A., Noble B. S., McWhir J. 2006. Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Cloning Stem Cells.* 8 : 16—31.
- Ginis I., Luo Y., Takumi M., Thies S., Brandenberger R., Ge-recht-Nir S., Amit M., Hoke A., Carpenter M. K., Itskovitz-Eldor J., Rao M. S. 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Develop. Biol.* 269 : 360—380.
- Guhr A., Kurtz A., Friedgen K., Loser P. 2006. Current state of human embryonic stem cell research: an overview of cell lines and their use in experimental work. *Stem Cells.* 24 : 2187—2191.
- Guo J., Jauch A., Holtgreve-Grez H., Scheli B., Erz D., Schrank M., Janssen J. W. G. 2005. Multicolor karyotype analyses of mouse embryonic stem cells. *In Vitro Cell Develop. Biol.* 41 : 278—283.
- Hanson C., Caisander G. 2005. Human embryonic stem cells and chromosome stability. *ARMIS.* 113 : 751—755.
- Heins N., Englund M. C., Sjoblom C., Dahl U., Tønning A., Bergh C., Lindahl A., Hanson C., Semb H. 2004. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 22 : 367—376.
- Heins N., Lindahl A., Karlsson U., Rehnstrom M., Caisander G., Emanuelsson K., Hanson C., Semb H., Bjorquist P., Sartipy P., Hyllner J. 2006. Clonal derivation and characterization of human embryonic stem cell lines. *J. Biotechnol.* 122 : 511—520.
- Hirano T., Ishihara K., Hibi M. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 19 : 2548—2556.
- Hirano T., Nakajima K., Hibi M. 1997. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8 : 241—252.
- Hoffman L. M., Hall L., Batten J. L., Young H., Pardasani D., Baetge E. E., Laerence J., Carpenter M. K. 2005. X-inactivation status varies in human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 23 : 1468—1478.
- Humphrey R. K., Beattie G. M., Lopez A. D., Bucay N., King C. C., Firpo M. T., Rose-John S., Hayek A. 2004. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells.* 22 : 522—530.
- Hwang W. S., Roh S. L., Lee B. C., Kang S. K., Kwon D. K., Kim S., Kim S. J., Ahn C., Paek S. H., Chang S. S., Koo J. J., Yoon H. S., Hwang J. H., Park Y. S., Oh S. K., Kim H. S., Park J. H., Moon S. Y., Schatten G. 2005. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science.* 308 : 1777—1783.
- Hwang W. S., Ryu Y. J., Park J. H., Park E. S., Lee E. G., Koo J. M., Jeon H. Y., Lee B. C., Kang S. K., Kim S. J., Ahn C., Hwang J. H., Park K. Y., Cibelli J. B., Moon S. Y. 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science.* 303 : 1669—1674.
- Iles S. A., Evans E. P. 1977. Karyotype analysis of teratocarcinomas and embryoid bodies of C3H mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 38 : 77—91.
- Inzunza J., Gertow K., Stromberg M. A., Matilainen E., Blennow E., Skottman H., Wolbank S., Ahrlund-Richter L., Hovatta O. 2005. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells.* 23 : 544—549.
- Inzunza J., Sahlen S., Holmberg K., Strömberg A. M., Teerijoki H., Blennow E., Hovatta O., Malmgren H. 2004. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. *Mol. Human Reprod.* 10 : 461—466.
- Jentsch I., Geigl J., Klein C. A., Speicher M. R. 2003. Seven-fluorochrome mouse M-FISH for high-resolution analysis of inter-chromosomal rearrangements. *Cytogenet. Genome Res.* 103 : 84—88.
- Kishimoto T. 1994. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells.* 12 (Suppl. 1) : 37—44.
- Klimanskaya I., Chung Y., Becker S., Lu S.-J., Lanza R. 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature.* 444 : 481—485.
- Ko M. S., Kitchen J. R., Wang X., Threat T. A., Wang X., Hasegawa A., Sun T., Grahovac M. J., Kargul G. J., Lim M. K., Cui Y., Sano Y., Tanaka T., Liang Y., Mason S., Paonessa P. D., Sals A. D., DePalma G. E., Sharara R., Rowe L. B., Eppig J., Morrell C., Doi H. 2000. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development.* 127 : 1737—1749.
- Lagarkova M. A., Volchkov P. Y., Lyakisheva A. V., Philonenko E. S., Kiselev S. L. 2006. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. *Cell Cycle.* 5 : 416—420.
- Lee J. B., Lee J. E., Park J. H., Kim S. J., Kim M. K., Roh S., Yoon H. S. 2004. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol. Reprod.* 72 : 42—49.
- Li S. S.-L., Liu Y.-H., Tseng C.-N., Chung T.-L., Lee T.-Y., Singh S. 2006. Characterization and gene expression profiling of five new human embryonic stem cell lines derived in Taiwan. *Stem Cells Develop.* 15 : 532—555.
- Li T., Zhou C. Q., Mai Q. Y., Zhuang G. L. 2005. Establishment of human embryonic stem cell line from gamete donors. *Chin. Med. J.* 118 : 116—122.
- Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Distech C. M., Bornstein P., Jaenisch R. 1997. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Develop. Dyn.* 209 : 85—91.
- Longo L., Bygrave A., Grosveld F. G., Pandolfi P. P. 1997. The chromosome make up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimerism. *Transgenic Res.* 6 : 321—328.
- Ludwig T. E., Levenstein M. E., Jones M. J., 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. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24 : 185—187.
- Lysdahl H., Gabrielsen A., Minger S. L., Patel M. J., Fink T., Petersen K., Ebbesen P., Zahar V. 2006. Derivation and characterization of four new human embryonic stem cell lines: the Danish experience. *Reprod. Biomed. Online.* 12 : 119—126.
- Maitra A., Arking D. E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassauei K., Sui G., Culter D. J., Liu Y., Brimble S. N., Noaks-son K., Hyllner J., Schulz T. C., Zeng X., Freed W. J., Crook J., Abraham S., Colman A., Sartipy P., Matsui S. I., Carpenter M., Gazdar A. F., Rao M., Chakravarti A. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 37 : 1099—1103.
- Mallon B. S., Park K.-Y., Chen K. G., Hamilton R. S., McKay R. D. G. 2006. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 : 1063—1075.
- Mitalipova M. M., Rao R. R., Hoyer D. M., Johnson J. A., Meisner L. F., Jones K. L., Dalton S., Stice S. L. 2005. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23 : 19—20.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Rodder J. C. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice

from early-passage embryonic stem cells. *Develop. Biol.* 90 : 8424—8428.

Odorico J. S., Kaufman D. S., Thomson J. A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 19 : 193—204.

Oh S. K., Kim H. S., Ahn H. J., Seol H. W., Kim Y. Y., Park Y. B., Yoon C. J., Kim D. W., Kim S. H., Moon S. Y. 2005. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUH-ES1, SNUHES2, and SNUHES3. *Stem Cells.* 23 : 211—219.

Park J. H., Kim S. J., Oh E. J., Moon S. Y., Roh S., Kim C. G., Yoon H. S. 2003. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol. Reprod.* 69 : 2007—2014.

Park J. I., Yoshida I., Tada T., Takagi N., Takahashi Y., Kanagawa H. 1998. Trisomy 8 does not affect differentiative potential in a murine parthenogenetic embryonic stem cell line. *Jpn. J. Vet. Res.* 46 : 29—35.

Raz R., Lee C. K., Cannizzaro L. A., d'Eustachio P., Levy D. E. 1999. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 2846—2851.

Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong C., Trounson A., Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat. Biotechnol.* 18 : 399—404.

Richards M., Fong C. Y., Chan W. K., Wong P. C., Bongso A. 2002. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 20 : 933—936.

Rosler E., Fisk G. J., Ares X., Irving J., Miura T., Rao M. S., Carpenter M. K. 2004. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Develop. Dyn.* 229 : 259—274.

Sato N., Sanjuan I. M., Heke M., Uchida M., Naef F., Brivanlou A. H. 2003. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Develop. Biol.* 260 : 404—413.

Schuldiner M., Benvenisty N. 2003. Factorscontrolling human embryonic stem cell differentiation. *Meth. Enzymol.* 365 : 446—461.

Simon C., Escobedo C., Valbuena D., Genbacev O., Galan A., Krtolica A., Asensi A., Sanchez E., Esplugues J., Fisher S., Pellicer A. 2005. First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. *Fertil. Steril.* 83 : 246—249.

Skottman H., Mikkola M., Lunbdin K., Olsson C., Stromberg A. M., Tuuri T., Otonkoski T., Hovatta O., Lahesmaa R. 2005. Gene expression signatures of seven individual human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 23 : 1343—1356.

Strelchenko N., Kukharensko V., Shkumatov A., Verlinsky O., Kuliev A., Verlinsky Y. 2006. Reprogramming of human somatic cells by embryonic stem cell cytoplasm. *Reprod. Biomed. Online.* 12 : 107—111.

Strelchenko N., Verlinsky Y. 2006. Embryonic stem cells from morula. *Meth. Enzymol.* 418 : 93—108.

Suemori H., Yasuchika K., Hasegawa K., Fujioka T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N. 2006. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34 : 926—932.

Suzuki H., Kamada N., Ueda O., Jishage K., Kurihara Y., Kurihara H., Terauchi Y., Azuma S., Kadowaki T., Kodama T., Yazaki Y., Toyoda Y. 1997. Germ-line contribution of embryonic stem cells in chimeric mice: influence of karyotype and *in vitro* differentiation ability. *Exp. Anim.* 46 : 17—23.

Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126 : 663—676.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282 : 1145—1147.

Uhlmann F. 2001. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 : 754—761.

Van de Stolpe A., van den Brink S., van Rooijen M., Ward-van Oostwaard D., van Inzen W., Slaper-Cortenbach I., Fauser B., van den Hout N., Weima S., Passier R., Smith N., Denning C., Mummery C. 2005. Human embryonic stem cells: towards therapies for cardiac disease. Derivation of a Dutch human embryonic stem cell line. *Reprod. Biomed. Online.* 11 : 476—485.

Verlinsky Y., Strelchenko N., Kukharensko V., Rechitsky S., Verlinsky O., Galat V., Kuliev A. 2005. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod. Biomed. Online.* 10 : 105—110.

Wang J., Rao S., Chu J., Shen X., Lévassseur D. N., Theunissen T. W., Orkin S. H. 2006. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.* 444 : 364—368.

Ware C. B., Nelson A. M., Blau C. A. 2006. A comparison of NIH-approved human ESC lines. *Stem Cells.* 24 : 2677—2684.

Xiao L., Yuan X., Sharkis S. J. 2006. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 24 : 1476—1486.

Xu C., Inokuma M. S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J. D., Carpenter M. K. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19 : 971—974.

Zeng X., Miura T., Luo Y., Bhattacharya B., Condie B., Chen J., Ginis I., Lyons I., Mejido J., Puri R. K., CRao M. S., Freed W. J. 2004. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells.* 22 : 222—231.

Поступила 16 II 2007

HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS

PROBLEMS AND PERSPECTIVES

N. N. Nikolsky,¹ I. A. Gabay, N. V. Somova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: Nikolsky@mail.cytspb.rssi.ru

Establishment of human embryonic stem cell lines is one of the major achievements in the biological science in the XX century and has excited a wide scientific and social response as embryonic stem cells can be regarded in future as unlimited source of transplantation materials for the replacement cell therapy. To date human embryonic cell lines are obtained in more than 20 countries. In our country the embryonic stem cell researches are carried out in the Institute of Cytology RAS and the Institute of Gene Biology RAS. ESC lines are derived from placed in culture inner cell mass of human preimplantation blastocysts used in the *in vitro* fertilization procedure. Studies with human ESC go in several directions. Much attention is paid to the elaboration of the optimal conditions for ESC cultivation, mainly to the development of cultivation methods excluding animal feeder cells

and other components of animal origin. Another direction is a scale analysis of gene expression specific for the embryonic state of the cells and corresponding signaling pathways. Many efforts are concentrated to find conditions for the directed differentiation of ESC into different tissue-specific cells. It has been shown that ESC are able to differentiate *in vitro* practically into any somatic cells. Some works are initiated to develop methods for the «therapeutic cloning», that is transfer and reactivation of somatic nuclei into enucleated oocytes or embryonic stem cell cytotlasts. Of great importance is human ESC line standardization. However, the standard requirements for the cells projected for research or therapeutic purposes may be different. It has been found that many permanent human ESC lines undergo genetic and epigenetic changes and, therefore, the cell line genetic stability should be periodically verified. The main aim of the review presented is a detailed consideration of the works analyzing the genetic stability of human and mouse ESC lines. Human ESC lines established in our and as well as in other countries couldn't be used so far in clinical practice. It is highly probable that undifferentiated ESC cannot be applied for therapeutic purposes because of the risk of their malignant transformation. Therefore, main efforts should be focused on the production of progenitor and highly differentiated cells suitable for transplantation derived from ESC.

Key words: human embryonic stem cells, permanent human ESC lines, genetic stability, mouse embryonic stem cells.
