

УДК 572(028)+575

В. К. САВЧЕНКО

## ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА И НОВЫЕ ПОДХОДЫ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

*Институт философии НАН Беларуси, Минск*

*(Поступила в редакцию 29.07.2013)*

**Введение.** Крупным событием в истории развития биомедицины стало секвенирование генома человека, которое открыло заманчивые перспективы в развитии новых биотехнологий для создания лекарств нового поколения с их точно определенным адресом воздействия на функционирование клеток, тканей и всего организма человека и использования их в клинической практике [1].

**Геном человека и развитие зародыша.** В момент оплодотворения при слиянии яйцеклетки и сперматозоида зарождается новая жизнь со своим уникальным генотипом, включающим более 21 тыс. генов. Эти гены контролируют весь процесс онтогенеза – от формирования зародыша до взросления и завершения жизненного цикла человека. Этот процесс протекает в постоянном взаимодействии генов между собой и внешней средой.

В клетках человека продукты материнских генов направляют и контролируют ранние стадии развития зародыша, включая формирование главных осей будущего тела. Гены, контролирующие развитие зародыша, функционируют в соответствии с градиентом генных продуктов, локализованных как внутри клетки, так и в разных частях развивающегося зародыша. Регуляция активности этих генов осуществляется по иерархическому принципу: экспрессия генов на ранних стадиях регулирует активность генов, экспрессируемых на последующих стадиях. Регуляция активности генов в процессе развития осуществляется на основе сетевого принципа, согласно которому каждый отдельный ген функционирует в тесной связи с комплексом других ассоциированных генов. Многие фундаментальные процессы, связанные с формированием в ходе онтогенеза человека новых тканевых структур, сходны с аналогичными процессами, имеющими место в онтогенезе животных. Онтогенез включает последовательную дифференциацию исходных клеток – от первых делений оплодотворенного яйца в специализированные клетки органов и тканей, а также в клетки независимого от них зародышевого пути к следующему поколению. В теле человека в настоящее время различают более 200–300 различных типов зрелых дифференцированных клеток [2].

Геном человека содержит наследственную программу, при развертывании которой последовательно включаются и выключаются различные сети генов в дифференцирующихся клетках разных тканей. Этот детерминированный геномом и внешней средой процесс регуляции развития зародыша напоминает чередование картинок в калейдоскопе. Регуляция активности генов в ходе развития осуществляется с помощью трансмембранных рецепторов, которые обычно локализируются на поверхности дифференцирующихся клеток, но могут находиться также в их цитоплазме или ядре. Эти рецепторы воспринимают молекулярный сигнал, переносимый лигандом прямого или непрямого действия, и передают сигнал клетке, в результате чего изменяется ее функционирование. В роли лиганда обычно выступают различные по химической структуре гормоны.

**Стволовые клетки.** Клетки эмбриона, возникшего в результате деления оплодотворенной яйцеклетки, способны превращаться в любую дифференцированную клетку плода, т. е. они являются *тотипотентными* стволовыми клетками. В ходе дальнейших делений ооцита в результате пространственной локализации генных продуктов на различных участках развивающегося зародыша потенциал трансформации клеток постоянно меняется, при этом возможности дифферен-

циации различных клеточных линий ограничиваются. *Плюрипотентные* стволовые клетки внутреннего слоя бластоцита способны дифференцироваться в любые клетки тканей и органов человека, за исключением клеток плаценты; *мультипотентные* – в ряд или целое семейство близкородственных клеток; *олигопотентные* – в небольшое число типов клеток, таких, например, как лимфоидные или миелоидные клетки. *Унипотентные* клетки способны воспроизводить лишь свой собственный тип, но они обладают свойством самообновления, т. е. способностью проходить ряд делений без дифференциации, что отличает их от обычных нестволовых клеток [3, 4].

Стволовые клетки в незначительных количествах сохраняются практически во всех тканях взрослого организма и вместе с прогениторными клетками-предшественниками обеспечивают восстановление тканей в процессе жизни, включая постоянную замену клеток крови, кожных покровов, печени и желудочно-кишечного тракта. Это становится возможным благодаря тому, что наряду с регулярным митозом происходит также асимметричное деление стволовых клеток, в результате которого возникают одна дифференцированная и одна взрослая стволовая клетка. В случае спонтанного деления стволовой клетки одна из ее дочерних клеток дает две стволовые, а вторая – две дифференцированные. Поэтому различают эмбриональные и соматические стволовые клетки. Некоторые авторы действительно стволовыми считают лишь эмбриональные тотипотентные и плюрипотентные клетки [5].

Эмбриональные стволовые клетки могут быть получены из внутренней клеточной массы бластоцитов на протяжении первых 4–6 дней развития оплодотворенной зиготы, а соматические – из различных тканей взрослого организма, включая клетки зародышевого пути. На специальной питательной среде эти стволовые клетки можно превратить в стволовые клеточные линии и в дальнейшем использовать их для исследований, а также для восстановления поврежденных тканей пациентов в условиях клиники. Количественно свойства этих клеток можно охарактеризовать их клоногенной способностью, т. е. способностью отдельных изолированных клеток в ходе деления давать начало колонии, клону или клеточной линии. Для идентификации таких линий можно использовать также молекулярные маркеры, располагающиеся на внешней поверхности клеточной стенки. Важным качественным свойством стволовых клеток является их способность к дифференциации в клетки разных специализированных тканей тела человека [6, 7].

Хорошо известным терапевтическим приемом является пересадка клеток костного мозга. Соматические стволовые клетки костного мозга, способные в процессе жизненного цикла дифференцироваться в красные, белые и ряд других клеток крови, по сосудам попадают в различные органы и ткани и могут быть обнаружены, сепарированы и изолированы. Стволовые клетки периферической крови используют для лечения лейкемии, других болезней крови, иммунной системы и ряда раковых заболеваний.

Другим источником этих клеток является пуповина новорожденных. Эти клетки можно использовать для трансплантации вместо стволовых клеток костного мозга и периферической крови. При этом рост эффективности трансплантации, по-видимому, связан с тем, что иммунная система клеток пуповины еще не обладает такой высокой способностью идентифицировать чужеродные антигены, как соматические клетки других зрелых тканей. Доступность и эффективность этих стволовых клеток при трансплантации делает их ценным биологическим ресурсом для регенеративной медицины [8].

Изолированные клетки для последующей идентификации в качестве стволовых должны быть подвергнуты прежде всего анализу *in vitro* на их способность дифференцироваться и самовозобновляться. Идентификацию можно осуществить с помощью цитогенетического анализа в лаборатории под микроскопом или с применением биологического теста, позволяющего определить способность отдельных стволовых клеток производить другие клетки крови и восстанавливать иммунную реакцию. Для подтверждения плюрипотентности изолированных эмбриональных клеток изучают способность этих клеток спонтанно дифференцироваться в культуре, манипулируя их жизнедеятельностью с помощью различных молекулярных реагентов, а также оценивают их иммуновосстановительную способность путем перевивки их в тело экспериментальных линий мышей с иммунодефицитом. Культивирование стволовых клеток *in vitro* является необходимым этапом для программирования путей их последующей дифференциации. Процесс наработки

эмбриональных стволовых клеток в культуре идет быстрее, чем соматических стволовых, но методы культивирования последних быстро совершенствуются.

Для культивирования эмбриональных стволовых клеток человека требуется питательный слой-подложка, который формируют из эмбриональных стволовых клеток мышей или из фибробластов. Для культивирования эмбриональных стволовых клеток самих мышей такого слоя не требуется, достаточно введения в культуру транскрипционного фактора. Транскрипционные факторы Oct-4, Nanog, Sox2 вместе составляют регуляторную сеть, которая предотвращает дифференциацию эмбриональных стволовых клеток человека в культуре и одновременно обеспечивает их собственное деление и сохранение плюрипотентности. Для идентификации эмбриональных стволовых клеток человека обычно используют гликолипиды SSEA3 и SSEA4, антигены Tra-1-60 и Tra-1-81 [9, 10]. В последнее время получены данные, что в процессе репрограммирования с помощью продуктов транскрипции генома человека стволовые клетки кожи взрослого человека могут стать плюрипотентными аналогами эмбриональных клеток. Обнаружено также, что клетки окоплодной жидкости обладают свойством мультипотентности. Они способны дифференцироваться в разные типы тканей человека, включая клетки крови, нервной, мышечной, костной и ряда других тканей. Эти достижения открывают широкие возможности для развития регенеративной медицины.

**Репрограммирование соматических клеток.** После слияния женской и мужской половых клеток естественный процесс репрограммирования клеток в ходе развития эмбриона осуществляется многократно. В геноме человека и других млекопитающих содержится сеть генов, которые направляют развитие зародыша и последовательно формируют основные структуры будущего тела. Регуляция осуществляется на основе метилизации отдельных участков геномной ДНК и эффекта импринтинга генома. Метилизация предотвращает транскрипцию генов, и стирание этих эпигеномных меток обоих родительских геномов осуществляется в каждом цикле деления клеток зародышевого пути сразу же после его выделения в развивающемся эмбрионе. В ходе последующего гаметогенеза взрослого организма метильные метки геномной ДНК родителей воссоздаются вновь в соответствии с полом образующейся гаметы.

Искусственное репрограммирование ооцитов осуществляют при помощи удаления их ядер и помещения в безъядерную цитоплазму диплоидного ядра из соматической клетки в технологии клонирования, а также путем слияния двух разных клеток и их ядер при получении химер. Недавно стало возможным репрограммировать геном соматических клеток в состояние плюри- или мультипотентности с помощью упомянутых выше факторов транскрипции.

По экспрессии генов, синтезу белков, узорам метилизации хроматина, формированию жизнеспособных химер, эмбрионного тела и потенций развития, а также по способности дифференцироваться в разные типы тканей индуцированные плюрипотентные клетки во многом схожи с эмбриональными стволовыми клетками. Последние могут быть получены из соматических клеток пациента, что уменьшает опасность их отторжения при трансплантации [11–13].

Использование репрограммированных стволовых клеток в клинике может быть связано с риском, особенно в том случае, если для модификации генома таких клеток использовался вирусный вектор. Дело в том, что вирусный вектор может запустить экспрессию онкогена, который вызывает развитие злокачественной опухоли у пациента, а также возможна потеря активности трансгенной конструкции после встройки в его геномную ДНК. В 2008 г. был предложен метод для удаления онкогенов после индукции плюрипотенции [14]. Эпигенетическое репрограммирование соматических клеток с помощью участков ДНК включает использование плазмид, миниколец, транспозонов, эписом и специальных многоцистронных конструкций для гомологической рекомбинации. Однако эти подходы несут угрозу непредвиденной модификации реципиентного генома стволовых клеток. В 2009 г. был предложен метод индукции плюрипотентных стволовых клеток без модификации их генома с помощью повторяющихся воздействий одними лишь специальными белковыми молекулами [15]. Такой подход представляется предпочтительным, но он трудоемкий и требует организации экспрессии рекомбинантного белка и его очистки, при этом репрограммирование осуществляется с низкой частотой [16].

Упрощение и повышение эффективности технологии репрограммирования соматических клеток связано с возможностью использования в этом процессе более простых молекул вместо отдельных генов или дорогих белков. Пока не удалось создать полностью эффективной смеси небольших молекул для успешного репрограммирования взрослых клеток в тотипотентность или плюрипотентность, но уже удалось заменить ведущую роль одного или нескольких генов в процессе прямого репрограммирования таких клеток.

Технология репрограммирования взрослых соматических клеток включает несколько этапов. Сначала необходимо изолировать и наладить культивирование донорских клеток, а затем провести трансфекцию этих клеток с помощью вирусного вектора с генами, способствующими их превращению в стволовые клетки. После этого клетки, экспрессирующие экзогенные гены, отбирают и помещают в среду для культивирования эмбриональных стволовых клеток человека, используя слой митотически инактивированных клеток-кормильцев (обычно это культура эмбриональных стволовых клеток мыши). Небольшое количество трансфицированных взрослых клеток человека постепенно превращается в индуцированные стволовые клетки, которые образуют колонии, подобные колониям эмбриональных стволовых клеток.

В качестве вектора для трансфекции взрослых клеток используют, как правило, ретровирусы. Переносимые гены обычно включают регуляторы транскрипции *Oct3/4* и *Sox2*, а также два других гена, повышающих эффективность индукции потентности. После 3–4 недель культивирования небольшое количество трансфицированных клеток морфологически и биохимически напоминает культуру плюрипотентных клеток. Их изолируют путем морфологического отбора, экспрессии генов-репортеров или с помощью селекции с применением антибиотиков.

Биотехнология репрограммирования клеток сначала отработывалась на мышах, а в 2007 г. две группы исследователей опробовали ее и на клетках человека. Группа Яманака (Shinya Yamanaka) из Киотского университета использовала четыре ключевых гена – *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *myc* с ретровирусным вектором для репрограммирования клеток фибробластов человека [17]. Группа Томпсона (James Thomson) из Университета Висконсин–Мэдисон успешно опробовала гены *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и *LIN28* с лентивирусной системой доставки [18].

Для искусственной индукции плюрипотентности соматических клеток в настоящее время в клиниках используют гены, принадлежащие к разным семействам. Ген *Oct3/4* и ряд генов семейства *Sox* (*Sox1*, *Sox2*, *Sox3*, *Sox15*) являются ключевыми регуляторами транскрипции, и без их участия репрограммирование клеток невозможно. Многие гены из семейств *Klf* (*Klf1*, *Klf2*, *Klf4*, *Klf5*) и *Myc* (*c-myc*, *L-myc*, *N-myc*), а также гены *Nanog* и *LIN28* повышают эффективность репрограммирования клеток и индукцию их плюрипотентности.

Использование транскрипционных факторов показало перспективность их применения в регенеративной медицине, однако имеется ряд нерешенных проблем и ограничений для их применения. Прежде всего это пока еще низкая эффективность репрограммирования соматических клеток, которая находится на уровне 0,01–0,1 % обработанных клеток в культуре. Необходимо оптимизировать время, баланс и уровень экспрессии генов, участвующих в репрограммировании. Популяции культивируемых соматических клеток нуждаются в специальных подготовительных генетических и эпигенетических воздействиях и изменениях. Вторая проблема заключается в том, что интеграция в геном целевых соматических клеток переносимых трансгенов может повышать частоту мутаций в целевых геномах. Во избежание этого предлагается использовать различные векторы, включая плазмиды, аденовирусы и транспозоны. Однако это может снизить частоту репрограммирования клеток. Третья проблема связана с тем, что факторы репрограммирования способны вызывать злокачественные опухоли. Инактивация или делеция супрессора опухолей *P53* повышает эффективность репрограммирования, что необходимо учитывать. Наконец, существует возможность неполного репрограммирования. На мышах было показано, что репрограммированные соматические стволовые клетки способны формировать эмбриональные фибробласты и жизнеспособный зародыш, что подтверждает эквивалентность эмбриональных и индуцированных стволовых клеток в отношении плюрипотентности. Вместе с тем некоторые технологии репрограммирования продемонстрировали ограниченное или неполное соответствие индуцированных стволовых клеток их эмбриональным аналогам.

С целью повысить эффективность репрограммирования были использованы разные биомолекулы малого размера, которые, как оказалось, могут положительно влиять на этот процесс. В частности, было показано, что гистон-деацетилаза повышает эффективность репрограммирования почти на два порядка за счет способности замещать воздействие транскрипционного фактора *c-myc* [19]. Подобный компенсаторный эффект проявляет ингибирование гистон- и метил-трансферазы при помощи молекулы VIX-01294 с одновременной активацией кальциевого канала в плазматической мембране [20]. Эти результаты указывают на то, что удачно подобранное сочетание генов и коротких молекул повышает эффективность репрограммирования соматических клеток в искусственные плюрипотентные стволовые клетки.

Во избежание формирования опухолей в результате репрограммирования и повышения эффективности самого процесса перспективным представляется использование альтернативных векторов, таких как аденовирусы, плазмиды, голая ДНК, белковые соединения. Аденовирусы не встраиваются в геном целевых клеток, поэтому их гены туда не проникают и не возникает опасности инсерционного мутагенеза. Они были успешно использованы для репрограммирования фибробластов человека в искусственные стволовые клетки [21]. Другим преимуществом аденовирусов является то, что требуется лишь краткосрочное присутствие их в клетке, чтобы ее репрограммирование состоялось.

С помощью двух плазмид удалось также репрограммировать соматические клетки мыши используя четыре гена. Первая из них экспрессировала фактор *c-myc*, вторая – три остальные (*Oct4*, *Klf4*, *Sox2*) [22]. Однако этот метод трансфекции оказался менее эффективным по сравнению с ретровирусным вектором, и кроме того, он требовал присутствия фактора, способствующего злокачественному росту, а сама такая плаزمид была способна интегрироваться в геном целевой клетки и стимулировать инсерционный мутагенез.

Указанные недостатки плазмид в качестве вектора подтолкнули к поиску транспозона в качестве переносчика конструкта из четырех ключевых факторов репрограммирования для инсерции в целевые соматические клетки. Транспозонная система piggyBac, например, способна эффективно доставлять и вырезать чужеродные гены, что устраняет угрозу инсерционного мутагенеза.

Показано, что альтернативой репрограммированию соматических клеток с помощью транскрипционных факторов может служить использование для этой цели белковых молекул, что позволяет вообще избежать проблемы инсерции. С помощью очищенных белков, способных мимикрировать действие транскрипционных факторов, удалось превратить взрослые клетки человека в эмбрионподобные (Major Step In Making Better Stem Cells From Adult Tissue // Sci. Daily. 2009. Vol. 4, N 5. P. 10–19). Был изучен естественный процесс превращения мезенхимных клеток человека в эпителиальные и роль разных биомолекул, способных ингибировать этот процесс, включая фактор трансформации роста бета (TGF $\beta$ ) и митоген – активаторную протеинкиназу (MEK). В результате было установлено, что молекулы ALK5 (ингибитор SB431412) и MEK (ингибитор PD0325901) при совместном введении способны эффективно стимулировать превращение фибробластов в искусственные плюрипотентные стволовые клетки. Добавление к этой паре молекул белка Thiazovivin, который принимает участие в пути, обеспечивающем выживание клеток, позволило примерно на два порядка повысить эффективность репрограммирования. При этом время самого процесса сократилось с 4 до 2 недель и инсерционный мутагенез был приостановлен.

В 2009 г. было показано, что использование коротких микроРНК, таких как miR-291, miR-294 и miR-295, экспрессируемых эмбриональными стволовыми клетками, повышает эффективность индуцированной плюрипотентности в сочетании с фактором *c-myc* [23]. Эти молекулы способны присоединяться к комплементарным последовательностям нуклеотидов иРНК, возможно, препятствуя при этом экспрессии репрессоров четырех транскрипционных факторов репрограммирования клеток.

Как правило, в качестве источника для репрограммирования используют клетки крови и фибробласты, которые получают с помощью биопсии кожи. В то же время при выделении взрослых клеток (тела) из мочи человека отпадает необходимость в биопсии или взятии образцов крови, а кроме того, такая процедура совершенно безболезненна для пациента. Необходимо учитывать также тот факт, что происхождение соматических клеток может влиять на эффективность репро-

граммирования, функциональные свойства индуцированных стволовых клеток и их способность стимулировать опухоли.

**Регенеративная медицина.** Этот термин используют для описания процесса замещения или регенерации клеток, тканей или органов человека, для возобновления или восстановления утраченных функций. Тритон и гидра обладают врожденной регенеративной способностью восстанавливать части своего тела. У человека эта способность сохранилась лишь в кроветворной системе, кожных покровах, печени и желудочно-кишечном тракте. Регенеративная медицина призвана устранить этот недостаток. Эта область знаний нацелена на биологическую регенерацию или искусственное замещение тканей и органов тела человека с целью излечения его от ранее неизлечимых и хронических болезней. Эта цель достигается либо с помощью стимулирования собственных восстановительных систем тела человека, либо путем выращивания в лабораторных условиях образцов тканей и органов и их последующей имплантации в тело пациента.

Наращивание регенеративной медициной своего потенциала для искусственного выращивания органов для последующей трансплантации пациентам позволит решить проблему нехватки донорских органов и спасти жизнь пациентам. При этом проблема иммунного барьера и вызванного этим отторжения чужеродных органов может быть решена, если исходные стволовые клетки или образцы тканей для терапии будут взяты у самого пациента.

Регенеративная медицина использует в настоящее время ряд медико-биологических подходов: терапию различных болезней с помощью стволовых и прогениторных клеток, стимулирование регенерации с использованием биологически активных молекул или биологических выделений специально подготовленных (путем иммуномодуляции) клеток, а также трансплантацию выращенных *in vitro* с применением клеточной и тканевой инженерии тканей и органов.

В ходе исследования, проведенного в Институте регенеративной медицины (штат Северная Каролина), взятые у пациентов образцы клеток мочевого пузыря и мускульной ткани были помещены на питательную среду в стеклянные чашки Петри. После того как была выращена большая популяция таких клеток, их поместили в специальную форму, напоминающую мочевой пузырь, и оставили размножаться. Когда искусственно выращенные мочевые пузыри созрели, их обратно трансплантировали пациентам. Отторжения таких искусственно выращенных органов не наблюдалось (сайт проф. Antony Atala. Wake Forest University Institute for Regenerative Medicine. 2010). В дальнейшем сотрудники этого института сделали попытку вырастить 22 других органа, включая печень, сердце, почки, яичники. Отметим, что в 2009 г. SENS Foundation объявила, что намерена финансово стимулировать использование достижений регенеративной медицины для восстановления тканей, клеток и внеклеточных структур непосредственно в теле человека с целью лечения возрастных болезней и физической беспомощности пожилых людей.

В последнее время для лечения незаживающих ран стали использовать аналоги гепарансульфата, под воздействием которого факторы роста и цитокины перемещаются во внеклеточный матрикс поврежденных тканей, что способствует их заживлению. Естественный гепарансульфат не задерживается в поврежденной ткани, поскольку он деградирует под действием гликоназ и гепараназ и поэтому молекула гепарансульфата уже не может сохранить и защитить факторы роста и цитокины, необходимые для регенерации. Синтетический миметик гепарансульфата устойчив к действию ферментов, поскольку имеет иное соединение субъединиц. Синтетический аналог гепарансульфата в опытах на лабораторных животных способствовал заживлению ран, сохраняя нормальную структуру регенерировавшей ткани и не оставляя рубцов [24–27].

За разработку технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) Нобелевская премия в области физиологии и медицины 2012 г. была присуждена Шине Яманака (Shinya Yamanaka) и Джону Гурдону (John B. Gurdon). Полученный ими результат имеет важное значение как для дальнейших исследований, так и для использования в терапевтических целях для регенеративной медицины. Эти клетки при соответствующем лабораторном сопровождении могут быть использованы для культивирования различных типов тканей тела человека. В настоящее время уже предприняты попытки использовать стволовые клетки для восстановления поврежденных в результате ожогов участков кожи человека, замещения клеток и тканей в случаях патологии мозга (болезни Паркинсона и Альцгеймера), а также введения стволовых кле-

ток в кровяное русло с целью терапии поврежденных тканей при болезнях сердца и при диабете, вызванном потерей или повреждением иммунной системой собственных клеток поджелудочной железы, синтезирующих инсулин.

Взрослые гематопоетические клетки крови и костного мозга давно использовались для лечения лейкемии, серповидно-клеточной анемии, иммунных болезней. Такие клетки способны дифференцироваться в разные типы клеток крови – от красных, переносящих кислород, до белых, отвечающих за иммунитет. Совсем недавно подобные стволовые клетки обнаружены в образцах крови из пуповины новорожденных и их плаценты. Предлагается создавать банки стволовых клеток для лечения в будущем как самих доноров, так и других нуждающихся пациентов. Эта новая технология способна служить заменой дорогостоящей инвазивной технологии извлечения и пересадки клеток костного мозга.

Поскольку использование для регенерации органов и тканей индуцированных плюрипотентных клеток связано с риском возникновения злокачественных и доброкачественных опухолей у пациентов, стали искать возможности уменьшения такой угрозы. Известно, что в процессе развития может наблюдаться превращение одних дифференцированных клеток в другой тип (метоплазия). Процесс может происходить естественным путем или под влиянием разного рода стимулирующих воздействий. Оказалось, что такая трансдетерминация захватывает не одну клетку, а целую группу, что указывает на немутационный характер таких трансформаций. Процесс может запустить один реагент, например 5-азациитидин, вызывающий демитилиацию ДНК, или же стимуляция лишь одного гена, например *MyoD1* [28–30].

Эти результаты послужили основой для разработки методов направленного репрограммирования клеток без прохождения стадии плюрипотентных стволовых клеток с помощью факторов стимулирования их трансдетерминации для целей регенеративной медицины [31, 32]. Прямое репрограммирование клеток требует меньше времени, а его эффективность во много раз выше. Для формирования индуцированных прогениторных клеток требуется всего несколько дней, тогда как на такой же процесс при использовании индуцированных плюрипотентных клеток требуется около двух недель. Причем для прямого репрограммирования иногда достаточно даже одного цикла клеточного деления. Главным его достоинством является то, что полученные в результате мультипотентные соматические стволовые клетки больше подходят для терапии, поскольку они не образуют тератом [33].

Интерес представляет метод получения стволовоподобных клеток *in vitro* из взрослых кератиноцитов и других эпителиальных клеток человека без генетических манипуляций. Это достигается с помощью комбинированного использования облученных клеток фибробластов, выступающих в качестве источника питания для эпителиальных клеток в культуре, и ингибитора Rho киназы Y-27632. Это воздействие вызывает усиленную пролиферацию эпителиальных клеток. Такое условное репрограммирование требует всего двух дней и вовлекает всю популяцию культивирующихся клеток. При удалении из культуры ингибитора киназы Rho Y-27632 и клеток-кормильцев пролиферация останавливается и клетки начинают нормально дифференцироваться. Эта технология позволяет из немногих клеток, изъятых путем игольной биопсии, получить за 5–6 дней культивирования популяцию объемом примерно 2 млн клеток, причем исходные клетки могут быть взяты как из живых, так и из криоконсервированных тканей [34–36].

Иной способ репрограммирования основан на использовании реагентов, способных ингибировать различные киназы или являющихся активаторами рецепторов (например, миосеверин, реверсин, липофосфатидная кислота и др.), что вызывает формирование клеток мышечной ткани, а также других клеток – предшественников жировых, костных и нервных тканей [37, 38]. Сердечно-сосудистые болезни выходят на первое место в клинической практике, что обуславливает пристальное внимание к ним регенеративной медицины. Клеточная терапия *in vivo* способна обеспечить рост сосудов и мышечных тканей и предотвратить формирование рубцов путем доставки в ткани области сердца факторов транскрипции или микроРНК [39–41].

Показано, что фибробласты сердца могут быть репрограммированы *in vivo* в кардиомиоциты путем локального введения транскрипционных факторов сердца после коронарной лигатуры. Это указывает на возможность прямой регенерации сердечной мускулатуры без введения стволовых

клеток. Однако процесс репрограммирования с помощью сверхэкспрессии транскрипционных факторов в фибробластах сердца осуществляется с невысокой эффективностью, а репрограммированные клетки отличаются фенотипически от зрелых естественных кардиомиоцитов и имеют сниженную экспрессию генов и слабую жизнеспособность [42]. В то же время удалось разработать способы получения популяции сердечных миоцитов *in vitro* путем модуляции сигнального пути Wnt в определенный момент дифференциации с помощью использования молекулярных реагентов малого размера [43]. Выявление механизмов, контролируемых формированием кардиомиоцитов, позволило предложить лекарственный препарат ITD-1, который эффективно удаляет с поверхности клеток рецептор TGF- $\beta$  и селективно подавляет внутриклеточную сигнальную систему TGF- $\beta$ , что способствует усилению трансформации клеток мезодермы в кардиомиоциты [44].

Кровеносные сосуды образуют обширную транспортную сеть для доставки в ткани и клетки тела питательных веществ и кислорода. С возрастом сосуды теряют эластичность и заполняются жировыми отложениями. Это вызывает такие болезни, как инфаркт миокарда, инсульт и атеросклероз артерий, питающих сердце, мозг и конечности. Поэтому меры по стимуляции роста сосудов для улучшения циркуляции крови служат защитой против возрастных болезней. Для стимуляции двустороннего коронарного роста сосудов можно использовать индуцированные прогениторные клетки, производимые частично репрограммированными эндотелиальными клетками, обладающими эпигенетической памятью и способными участвовать в процессах роста сосудов. После имплантации в миокард они встраиваются в сосуды и улучшают коронарный двусторонний поток лучше, чем естественные эндотелиальные клетки, индуцированные плюрипотентные, а также мезенхимные стволовые клетки [45].

Для улучшения функции стволовых клеток используется их генетическая модификация *ex vivo* с помощью, например, Pim-1 киназы, являющейся эффектором Akt, который позитивно влияет на генезис новых сосудов, культивируемых клеток костного мозга и прогениторных клеток сердца, изолированных из поврежденного миокарда [46, 47]. Это способствует долгосрочному восстановлению и улучшению гемодинамического функционирования поврежденного миокарда после его терапии модифицированными прогениторными клетками. Стволовые клетки, извлеченные из жировой ткани после липовысасывания из артерий и вен, могут быть превращены в прогениторные клетки гладкой мышцы (American Heart Association. July 25, 2012). Индуцированные прогениторные клетки могут использоваться как для восстановления, так и для создания сети кровеносных сосудов при тканевой инженерии и реконструкции органов для трансплантации.

Переливание крови необходимо многим пациентам, и оно зависит от наличия добровольных доноров. При этом сохраняется риск передачи инфекционных болезней, включая ВИЧ. Поэтому новые технологии производства *ex vivo* эритроидных клеток представляют клинический интерес как в настоящее время, так и в обозримом будущем. В пользу этого говорят данные о том, что красные кровяные тельца, полученные *in vitro* от позитивных клеток CD34, имеют нормальную жизнеспособность при переливании аутологичному реципиенту [48, 49]. К сожалению, красные кровяные тельца, полученные таким образом, содержат лишь фетальный гемоглобин, который обеспечивает их функциональность. При переливании эритроидных предшественников, полученных из индуцированных стволовых клеток, в организме наблюдается переход от фетального к взрослому гемоглобину [50]. Но при этом возникает иная проблема. Она заключается в том, что сами красные кровяные тельца не имеют ядра и поэтому не могут инициировать образование опухолей, однако их предшественники-эритробласты обладают такой способностью. Окончательное созревание эритробластов и их превращение в функциональные эритроциты сопровождается потерей ядра. Существующие методы репрограммирования способны нарушать этот процесс, и поэтому трансфузия эритроцитов, полученных *in vitro*, или их непосредственных предшественников эритробластов может вызвать образование опухолей. Короткое воздействие цитокинами на положительные клетки CD34 позволяет ускорить эритроидную дифференциацию и повысить выход стволовых и прогениторных эритроидных клеток. При этом полученные эритроциты экспрессируют глобиновый профиль, соответствующий возрасту исходных позитивных клеток CD34 [51].

Инфаркты, инсульты, невродегенеративные болезни Паркинсона и Альцгеймера, амиотрофный боковой склероз нуждаются в регенеративной терапии. Успешное использование конвертирован-

ных нервных клеток для трансплантации открывает новые возможности для лечения этих болезней [52]. Однако индуцированные нейроны, полученные из фибробластов, представляют собой конечные нейроны с низкой пролиферативной активностью, не способные дать достаточное количество аутологичных донорских клеток для трансплантации. Поэтому использование индуцированных нейральных стволовых клеток желательно в связи с их способностью к делению и самовозобновлению [53–56].

Было показано, например, что при специфических условиях культивирования фибробласты мышц могут быть репрограммированы для формирования индуцированных нейральных стволовых клеток с помощью фактора Sox2. Они способны самовозобновляться в культуре и после трансплантации выживать и интегрироваться, не вызывая опухолей в мозге мышей [57]. Предложен ряд иных методов прямой трансформации соматических клеток в индуцированные нейральные нервные стволовые клетки [58]. Теперь предстоит выяснить, какие из предложенных подходов наиболее соответствуют потребностям клиники.

Мезенхимные стволовые клетки обладают иммуноподавляющими свойствами и способны дифференцироваться в широкий спектр тканей мезенхимного происхождения. Это обусловило интерес к ним в связи с возможностями их использования в терапии сердечно-сосудистых, почечных, нервных, костных болезней, лечении связок и воспалительных процессов. Мезенхимные стволовые клетки встречаются среди взрослых клеток костного мозга и жировой ткани, где их доля не превышает 0,001–0,01 %. Причем с увеличением возраста пациента их качество и количество обычно уменьшается [59–61].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки могут быть получены путем омоложения клеток даже у пациентов преклонного возраста. Такие клетки, которые можно культивировать *in vitro*, являются хорошим источником для получения мезенхимных стволовых клеток. После обработки культуры клеток реагентом SB-431542 (ингибитором пути activin/TGF) из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека стремительно развиваются мезенхимные стволовые клетки. Причем полученные таким путем мезенхимные клетки имеют стабильный кариотип, проявляют способность к дифференциации и темпы роста, близкие к темпам роста естественных мезенхимных клеток. Это открывает хорошие перспективы использования культивируемых мезенхимных стволовых клеток в регенеративной медицине, хотя данные об их практическом применении в клинике пока отсутствуют [62, 63].

Альтернативным источником мезенхимных стволовых клеток являются многочисленные жировые ткани тела человека. Обнаружено, что их частота составляет 0,05 % в продуктах липо-высасывания [60]. Однако большое количество зрелых адипоцитов, утративших свою пролиферативную способность, может быть изолировано из суспензии жировых клеток и их можно вновь дифференцировать в свободные от жира фибробласт-подобные клетки. Они восстанавливают свою способность к пролиферации и приобретают мультипотентные возможности. Такие клетки по сравнению со взрослыми стволовыми клетками имеют преимущество в плане их численности, гомогенности и легкости изоляции. Эти клетки при соответствующей индукции в культуре *in vitro* или в условиях *in vivo* могут проявлять адипогенный, остеогенный, хондрогенный и миогенный потенциал. Они могут обладать также периваскулярными характеристиками и вызывать неоваскуляризацию [64, 65]. Наиболее часто в качестве материала для репрограммирования используют клетки крови и фибробласты, получаемые путем биопсии кожных покровов [66–68]. Но удобнее и безопаснее брать исходные клетки из образцов мочи пациента [69, 70]. От происхождения изолированных соматических клеток может зависеть эффективность репрограммирования, функциональные свойства индуцированных стволовых клеток и их способность в дальнейшем формировать опухоли [71–73].

**Этические и социальные проблемы.** Что касается этической стороны вопроса, то дебаты вокруг исследований в области эмбриональных стволовых клеток развернулись после публикации работы ученых из Университета Висконсин–Медисон, создавших в 1998 г. первую жизнеспособную лабораторную линию эмбриональных клеток человека. Для этого были изолированы плюрипотентные клетки из бластоцитов эмбриона человека и перенесены на питательную среду для их искусственного культивирования. Эмбрион человека в результате такой операции поте-

рял свою жизнеспособность и не смог развиваться со временем в полноценного ребенка. Этическая проблема заключалась в следующем: имеем ли мы моральное право ради терапии с помощью стволовых клеток одного человека жертвовать живым эмбрионом другого человека?

Возникла ситуация, аналогичная ситуации с искусственными абортами. Одни утверждали, что пятидневный зародыш еще не является человеком, в то время как другие придерживались мнения, что жизнь человека начинается с момента оплодотворения яйцеклетки. В последнем случае разрушение эмбриона путем изъятия бластоцитов для создания стволовых клеток аналогично сознательному умерщвлению будущего человеческого существа. Сторонники получения и использования эмбриональных стволовых клеток человека возражали, что жизнь в эмбрионе возникает после начала развития отдельных органов или после прохождения определенной фазы развития. В результате стали искать ответы на следующие непростые вопросы: жизнь начинается после оплодотворения или после рождения, эквивалентен ли эмбрион человека рожденному ребенку, имеет ли эмбрион человека свои права, может ли быть оправдано разрушение одного эмбриона ради лечения с помощью стволовых клеток многих пациентов, могут ли стволовые клетки стать источником новых эмбрионов в будущем?

Все эти дебаты привели к тому, что во многих странах возникли законодательные ограничения на получение эмбриональных стволовых клеток. В результате в Австрии, Германии, Дании, Ирландии и Франции производство культивируемых линий эмбриональных стволовых клеток было поставлено вне закона. В США нет запрета на исследования, связанные с эмбриональными стволовыми клетками, однако введено ограничение на финансирование таких работ из федеральных фондов. В Англии, Греции, Нидерландах и Швеции такие исследования не запрещены.

Полученные данные о присутствии мультипотентных стволовых клеток среди взрослых соматических клеток человека и разработка протоколов прямого репрограммирования таких клеток сняли остроту вопроса. На первый план вышли проблемы обеспечения безопасности регенеративной медицины при использовании этих технологий в клинической практике. Большие опасения вызывает способность индуцированных плюрипотентных стволовых клеток формировать опухоли у пациентов. Формирование тератом рассматривается в настоящее время в качестве серьезного препятствия для использования этих стволовых клеток в регенеративной медицине [74].

На сегодняшний день эффективное получение индуцированных плюрипотентных клеток возможно лишь в случае использования генетической модификации исходных соматических клеток. При этом считается, что такие клетки менее безопасны и более опухолегенны, чем эмбриональные стволовые клетки человека. Все гены, которые способствуют формированию индуцированных плюрипотентных клеток, так или иначе могут участвовать в возникновении рака. Некоторые из них представляют собой известные онкогены, включая и те, которые входят в семейство Мус. Если эти гены исключить и не использовать, то эффективность формирования индуцированных плюрипотентных клеток снижается почти на два порядка.

Показано, что при использовании рекомбинантных белков для производства индуцированных плюрипотентных клеток можно обойтись без использования генов для модификации клеток, однако эффективность такой технологии весьма низка [75]. В принципе развитие и улучшение этой методологии может повысить выход безопасных индуцированных стволовых клеток. Считается также, что использование аденовирусов или плазмид для генетической модификации соматических клеток более безопасно по сравнению с применением ретровирусных векторов.

Поскольку опухолегенная способность индуцированных плюрипотентных клеток оказалась выше, чем эмбриональных, остается полагаться на прямую оценку этой их способности (путем мимикрии на мышах) на основании тех протоколов, которые будут использованы для терапии с помощью регенеративной медицины. Во всяком случае, опухолегенная способность и безопасность использования в процессе терапии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток продолжает оставаться проблемой, вызывающей серьезную озабоченность исследователей [76].

С целью обойти этические запреты, связанные с производством и использованием в процессе исследований эмбриональных стволовых клеток человека, стали получать гибриды, цитоплазматические гибриды (цибриды) и химеры, которые включают клетки и ткани человека и животных. Такие действия вызывают критические замечания об этической недопустимости сме-

шения клеток и ДНК человека и животных. Гибридные эмбрионы получают путем оплодотворения яйцеклеток одного вида спермой другого вида. Для получения гибридного эмбриона ядро клетки человека или его целая клетка помещается в цитоплазму яйцеклетки другого вида, из которой удаляется ее собственное ядро. Такой гибрид содержит геном человека и примерно 13 генов другого вида, содержащихся в его митохондриях. Аргументом для создания гибридных и гибридных эмбрионов человек–животное для использования в исследованиях стволовых клеток являются практические и этические трудности, связанные с получением яйцеклеток человека от женщин-доноров [77].

В отношении допустимости использования взрослых и плюрипотентных стволовых клеток пуповины в клинике существует общественный консенсус. Что касается эмбриональных стволовых клеток, то разное отношение к ним в разных странах во многом обусловлено доминирующей в той или иной стране религиозной традицией. Все религии едины в том, что необходимо уважать и охранять жизнь человека, поскольку она священна, стремиться предупреждать и искоренять страдания из его жизни и устанавливать справедливый доступ для всех к достижениям, связанным с использованием стволовых клеток. В философии морали существует различие между понятиями «жизнь человека» и «личность человека». С личностью человека связано его неотъемлемое достоинство и права. С имеющимися в этом вопросе различиями в подходах разных религий, обусловленными тем, в какой момент, по их мнению, происходит одушевление эмбриона, связано и формирование отношения разных религий к получению и использованию эмбриональных стволовых клеток человека.

Представители православной и католической церкви считают, что человеческая жизнь начинается с момента зачатия. Поэтому, в целом принимая достижения науки в области стволовых клеток, они считают безнравственным и незаконным использование и разрушение эмбрионов человека для получения эмбриональных стволовых клеток. Неэтичными являются, по мнению представителей этих религий, как исследования на эмбрионах человека, так и уничтожение их избытка после успешного искусственного оплодотворения и имплантации в тело матери. Учитывая право эмбриона на жизнь, его использование для целей терапии и облегчения страданий больных также считается аморальным и недопустимым.

Представители протестантской церкви считают статус эмбриона высоким, но более низким по сравнению со статусом родившегося ребенка. Протестанты никогда не рассматривали эмбрион как человеческую личность. Они считают исследования стволовых клеток очень важными и настаивают на необходимости общественного обсуждения целей и принципов их проведения.

В иудаизме эмбрион никогда не рассматривали как человеческую личность и считали, что гаметы и эмбрионы, находящиеся за пределами тела, не имеют никакого легального статуса. Зародыш не является личностью до тех пор, пока его голова не появится на свет из тела женщины, но его ценность высока, поскольку он живой. Эмбрион получает душу через четыре дня от момента зачатия. Поскольку эмбриональные стволовые клетки получают из эмбрионов, полученных в результате оплодотворения в пробирке, их использование в исследованиях и в клинике не вызывает возражений. Такие действия направлены на уменьшение страданий людей.

В исламских странах считают, что человеческая жизнь начинается после вселения души в эмбрион, т. е. в период между 40-м и 120-м днем после зачатия. Использование в исследованиях «лишних» эмбрионов, оставшихся после оплодотворения в пробирке, не вызывает возражений, поскольку исследования эмбрионов и получение эмбриональных стволовых клеток направлены на уменьшение страданий людей. Искусственное создание эмбрионов человека для исследований вызывает возражение как неэтическое действие.

В индуизме и буддизме отсутствуют взвешенные оценки приемлемости получения и использования эмбриональных стволовых клеток. Подходы к этой проблеме различаются в разных странах. Центральным положением обеих религий является сочувственное отношение к другим людям. Обе религии принимают использование стволовых клеток в клинике и исследования в этой области как соответствующее их основному постулату сочувствия. В индуизме запрещается наносить любой вред всему живому миру, а эмбрион рассматривается как живое существо, поэтому использование эмбриональных стволовых клеток морально неприемлемо. Обе религии разделя-

ют положение о том, что реинкорнация душ осуществляется в момент зачатия, хотя некоторые течения индуизма относят момент зарождения личности на период между 3-м и 7-м месяцем жизни зародыша [78, 79].

**Заключение.** Хотя пересадка стволовых клеток костного мозга в клинике практиковалась на протяжении всего XX в., расшифровка генома человека создала благоприятные условия для создания широкого фронта исследований стволовых клеток, их репрограммирования и использования в регенеративной медицине XXI в. Это многообещающее направление биомедицинских исследований быстро прогрессирует и получает поддержку со стороны государственных органов, частных фондов и общества. Пока не решены полностью проблемы безопасности, морали и этики, но их осознание позволяет надеяться на успешное преодоление возможных преград в будущем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, договор № Г13Р-010 от 16 апреля 2013 г.

## Литература

1. Савченко В. К. // Актуальные вопросы антропологии. Минск, 2012. Вып. 7. С. 7–33.
2. Hartl D. L., Jones E. W. Essential Genetics. 2nd ed. Boston, 1999. – 552 p.
3. Корочкин Л. И. // Природа. 2005. № 6. С. 3–11.
4. Schöler H. R. Human biotechnology as Social Challenge. Ashgate Publishing, Ltd. 2007. P. 28.
5. Beckmann J., Scheitza S., Wernet P. et al. // Blood. 2007. Vol. 109, N 12. P. 5494–5501.
6. Ulloa-Montoya F., Verfaillie C. M., Hu W. S. // J. Biosci. Bioeng. 2005. Vol. 100, N 1. P. 12–27.
7. Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L. et al. // Nat. Biotechnol. 2007. Vol. 25, N 7. P. 803–816.
8. Mitalipov S., Wolf D. // Biotechnology. 2009. Vol. 114. P. 185–199.
9. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. // Cell. 2003. Vol. 113, N 5. P. 643–655.
10. Boyer L. A., Lee T. I., Cole M. F. et al. // Cell. 2005. Vol. 122, N 6. P. 947–956.
11. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. Vol. 126, N 4. P. 663–676.
12. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. // Nature. 2007. Vol. 448, N 7151. P. 313–317.
13. Gurdon J. B., Wilmut I. // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011. doi: 10.1101/cshperspect.a002659 originally published online. May 9, 2011.
14. Swaminathan Nikhil // Sci. Am. News. 30.11.2007. <http://www.sciam.com/article.cfm?id=stem-cells-without-cancer>.
15. Zhou H., Wu S., Joo J. Y. et al. // Cell Stem Cell. 2009. Vol. 4. P. 381–384.
16. Kim D., Kim C. H., Moon J. I. et al. // Cell Stem Cell. 2009. Vol. 4, N 6. P. 472–476.
17. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. // Cell. 2007. Vol. 131, N 5. P. 861–872.
18. Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K. et al. // Science. 2007. Vol. 318, N 5858. P. 1917–1920.
19. Huangfu D., Maehr R., Guo W. et al. // Nat. Biotechnol. 2008. Vol. 26, N 7. P. 795–797.
20. Despons S., Despons C., Do J. T. et al. // Cell Stem Cell. 2008. Vol. 3, N 5. P. 568–574.
21. Zhou W., Freed C. R. // Stem Cells. 2009. Vol. 27, N 11. P. 2667–2674.
22. Yamanaka K., Nakagawa M., Hyenjong H. et al. // Science. 2008. Vol. 322, N 5903. P. 949–953.
23. Judson R. L., Babiarz J. E., Venere M., Blalock R. // Nat. Biotechnol. 2009. Vol. 27. P. 459–461.
24. Barrientos S., Stojadinovic O. et al. // Wound Repair Regen. 2008. Vol. 16, N 5. P. 585–601.
25. Tong M., Tuk B. et al. // Wound Repair Regen. Vol. 17, N 6. P. 840–852.
26. Van Neck J. W., Zuidema Y. S. et al. // Eur. J. Dermatol. 2011. Vol. 21, N 3. P. 451–452.
27. Van Neck J., Tuk B., Barritault D., Tong M. Tissue Regeneration – From Basic Biology to Clinical Application. Prof. Jamie Davies (ed.). 2012. P. 69–92.
28. Slack J. M. // J. Pathol. 2009. Vol. 217, N 2. P. 161–168.
29. Wei G., Schubiger G., Harder F., Müller A. M. // Stem Cells. 2000. Vol. 18. P. 409–414.
30. Melanie I. W., Setiawan L., Hariharan I. K. // Ann. Rev. of Genetics. 2012. Vol. 46. P. 289–310.
31. Qian L., Huang Y., Spencer C. I., Foley A. et al. // Nature. 2012. (E. pub. 18 April). doi: 10.1038/nature11044.
32. Han D. W., Tapia N., Hermann A. et al. // Cell Stem Cell. 2012. Vol. 10, N 4. P. 465–472.
33. Vierbuchen T., Wernig M. // Nat. Biotechnol. 2011. Vol. 29, N 10. P. 892–907.
34. Liu X., Ory V., Chapman S. et al. // The Am. J. of Pathol. 2012. Vol. 180, N 2. P. 599–607.
35. Terunuma A., Lingala R. P., Park C. J. et al. // Tissue Eng. Part A. 2010. Vol. 16, N 4. P. 1363–1368.
36. Supryniewicz F. A., Upadhyay G., Krawczyk E. et al. // PNAS. 2012. Vol. 109, N 49. P. 20035–20040.
37. Jung D.-W., Williams D. R. // ACS Chem. Biol. 2011. Vol. 6, N 6. P. 553–562.
38. Kim W. H. et al. // ACS Chem. Biol. 2012. Vol. 7, N 4. P. 732–743.
39. Qian L., Huang Y., Spencer C. I. et al. // Nature. 2012. Vol. 485, N 7400. P. 599–604.
40. Jayawardena T. M., Egemnazarov B., Finch E. A. et al. // Circulation Res. 2012. Vol. 110, N 11. P. 1465–1473.
41. Chunhui X. // Trends in Molecular Medicine. 2012. Vol. 18. Iss. 10. P. 575–576.
42. Chen J. X., Krane M., Deutsch M.-A. et al. // Circulation Res. 2012. Vol. 111. P. 50–55.
43. Lian X., Hsiao C., Gisela W. et al. // PNAS. 2012. Vol. 109, N 27. P. E1848–E1857.

44. Willems E., Cabral-Teixeira J. et al. // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 11, N 2. P. 242–252.
45. Yin L., Ohanyan V., Pung Y. F., Chilian W. M. // *Circulation Res*. 2012. Vol. 110. P. 241–252.
46. Quijada P., Toko H., Fischer K. M. et al. // *Circulation Res*. 2012. Vol. 111. P. 77–86.
47. Mohsin S., Mohsin K., Toko H. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol*. 2012. Vol. 60, N 14. P. 1278–1287.
48. Zeuner A., Martelli F. et al. // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30. P. 1587–1596.
49. Giarratana M. C., Rouard H., Dumont A. et al. // *Blood*. 2011. Vol. 118, N 19. P. 5071–5079.
50. Kobari L., Yates F., Oudrhiri N. et al. // *Haematologica*. 2012. Vol. 97, N 12. P. 1795–1803.
51. Migliaccio A. R., Whitsett C., Papayannopoulou T., Sadelain M. // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 10, N 2. P. 115–119.
52. Zhang W., Duan S., Li Y. et al. // *Protein Cell*. 2012. Vol. 3, N 2. P. 91–97.
53. Lujan E., Chanda S., Ahlenius H. et al. // *PNAS*. 2012. Vol. 109, N 7. P. 2527–2532.
54. Their M., Wörsdörfer P., Lakes Y. B. et al. // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 2. Iss. 2. P. 41–44.
55. Han D. W., Tapia N., Hermann A. et al. // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 10. Iss. 4. P. 465–472.
56. Sheng C., Zheng Q., Wu J. et al. // *Cell Res*. 2012. Vol. 22. P. 769–772.
57. Ring K. L., Leslie M., Tong L. et al. // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 11. Iss. 1. P. 100–109.
58. Liu G.-H., Yi F., Suzuki K. et al. // *Cell Res*. 2012. Vol. 22. P. 1087–1091.
59. Peng Y., Huang S., Cheng B. et al. // *Ageing Res. Rev*. 2013. Vol. 12. P. 103–115. Available online 30 April, 2012. doi: org/10.1016/j.arr.2012.04.005.
60. Bieback K., Kern S., Kocaomer A. et al. // *Biomed. Mater. Eng*. 2008. Vol. 18. P. S71–S76.
61. Stolzing A., Jones E., McGonagle D. et al. // *Mech. Ageing Dev*. 2008. Vol. 129. P. 163–173.
62. Lapasset L. et al. // *Genes Dev*. 2011. Vol. 25. P. 2248–2253.
63. Chen Y. S., Pelekanos R. A., Ellis R. L. et al. // *Stem Cells Transl. Med*. 2012. Vol. 1, N 2. P. 83–95.
64. Poloni A., Maurizi G., Leoni P. et al. // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, N 5. P. 965–974.
65. Shen J. F., Sugawara A., Yamashita J. et al. // *Int. J. Oral Sci*. 2011. Vol. 3, N 3. P. 117–124.
66. Geti I., Ormiston M. L., Rouhani F. et al. // *Stem Cells Transl. Med*. 2012. Publ. on line 29 Nov. 2012. doi:10.5966/sctm.2012-0093.
67. Staerk J., Dawlaty M. M., Gaoet Q. et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 7, N 1. P. 20–24.
68. Park T. S., Huo J. S., Peters A. et al. // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, N 8. e42838. doi:10.1371/journal.pone.0042838.
69. Zhou T., Benda C., Duzinger S. et al. // *J. Am. Soc. Nephrol*. 2011. Vol. 22. P. 1221–1228.
70. Zhou T., Benda C., Duzinger S. et al. // *Nature Protocols*. 2012. Vol. 7, N 12. P. 2080–2089.
71. Polo J. M., Liu S., Figueroa M. E. et al. // *Nat. Biotechnol*. 2010. Vol. 28. P. 848–855.
72. Miura K., Okada Y., Aoi T. et al. // *Nat. Biotechnol*. 2009. Vol. 27. P. 743–745.
73. Liang Y., Zhang H., Feng Q. S. et al. // *Chin. J. Cancer*. 2012. doi: 10.5732/cjc.012.10065. (Epub. date: 2012-6-14).
74. Knoepfler P. S. // *Stem Cells*. 2009. Vol. 27, N 5. P. 1050–1056.
75. Zhou H., Wu S., Joo J. Y. et al. // *Cell Stem Cell*. 2009. Vol. 4. P. 381–384.
76. Gutierrez-Aranda I. et al. // *Stem Cells*. 2010. Vol. 28, N 9. P. 1568–1570.
77. Robert J. S. // *Bioessays*. 2004. Vol. 26. P. 1005–1012.
78. The Human Embryonic Stem Cell Debate // S. Holland, K. Lebacqz, L. Zoloth (eds). Cambridge, 2001.
79. The Pew Forum on Religion and Public Life, Religious Groups' Official Positions on Stem Cell Research, July 17, 2008. <http://pewforum.org/docs/?DocID=319>.

U. K. SAUCHANKA

## HUMAN GENOME AND NEW APPROACHES IN REGENERATIVE MEDICINE

### Summary

The sequencing of the human genome has become a major event in the development of biomedicine that opened real perspectives for the creation of new biotechnologies to be used in clinical practice and for the preparation of new-generation drugs with their precisely defined impact on the functioning of cells, tissues, and the whole organism. There appeared the favorable conditions for the development of extensive studies of embryonic and induced pluripotent stem cells and different technologies for reprogramming human adult cells and their practical use in regenerative medicine. This promising area of biomedical research is in rapid progress and is widely supported. Now the problems of safety, morals, and ethics are not yet completely solved, but their awareness allows one to hope for success in overcoming possible obstacles in the future.