ОБЗОРЫ

Терапевтическое клонирование. Современные подходы к получению пациент–специфичных линий эмбриональных стволовых клеток

Т.А. Свиридова–Чайлахян, Л.М. Чайлахян
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Therapeutic cloning. Modern approaches to obtain the patient–specific embryonic stem cell lines

T.A. Sviridova–Chailakhyan, L.M. Chailakhyan
Institute of the Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino

Обзор посвящен актуальному биомедицинскому направлению в заместительной клеточной терапии – терапевтическому клонированию, которое является наиболее универсальным подходом для получения пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) с колоссальными возможностями в поддержании и восстановлении здоровья человека. В обзоре также представлены альтернативные подходы и тенденции в получении ЭСК человека, которые, в отличие от терапевтического клонирования, пока далеки от выхода в клиническую практику. Уникальная ценность ЭСК в лечебных целях определяет серьезную потребность в развитии терапевтического клонирования и в нашей стране.

Ключевые слова: терапевтическое клонирование, соматические клетки, пересадка ядер, эмбриональные стволовые клетки.

The review is focused on the therapeutic cloning representing the actual biomedical direction in the replacment cell therapy. Therapeutic cloning is a highly universal approach for generating the patient specific embryonic stem cell (ESC) lines with the unlimited potential to support and recover human health. Alternative approaches and tendencies in generating human ESCs are also discussed, all of which however, in contrast to therapeutic cloning, have not resulted in clinical application yet. The unique value of ESC for medical purposes requires the development of therapeutic cloning in our country.

Key words: therapeutic cloning, somatic cells, nuclear transfer, embryonic stem cells.

Введение

Основой для возникновения одного из самых перспективных биомедицинских направлений в заместительной клеточной терапии – терапевтического клонирования явились два важнейших открытия конца XX века. Это, во-первых, создание клонированной овечки Долли [1], во-вторых, получение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из бластоцист [2] и примордиальных зародышевых клеток человека [3]. В первом случае убедительно показано для млекопитающих, что если в энуклеированный овоцит ввести ядро соматической клетки взрослого организма, то под влиянием цитоплазмы овоцита ядро такой клетки репрограммируется и способно дать начало развитию эмбриона (клона), геном которого идентичен геному организма – донора ядер. Во втором случае показано, как можно получать и культивировать ЭСК человека. Объединение этих двух важных достижений создает принципиальную возможность получения пациент-специфичных линий ЭСК и на их основе прогениторных клеток, детерминированных в определенном направлении (например, клетки гематопоэтического ряда), которые, по существу, будут клетками самого пациента, и полностью с ним иммуносовместимыми. В этом состоит главный смысл и главная цель терапевтического клонирования. Сейчас основными источниками получения стволовых клеток непосредственно для биомедицинских работ являются стволовые клетки из пуповинной крови и стволовые клетки взрослых. Оба источника имеют серьезные ограничения: стволовые клетки пуповинной крови аутогенны только вновь рожденным, а получение стволовых клеток от самого пациента небезопасно для него. Кроме того, по общему мнению, потенциальные возможности к дифференцировке у этих клеток ниже, чем у ЭСК. Очевидно, что наиболее универсальный и надежный источник получения стволовых клеток (СК) человека – с помощью технологий клонирования.

Перспективные потребности в терапевтическом клонировании

Можно уверенно утверждать, что перспективные потребности в терапевтическом клонировании неограничены, поскольку этот подход позволяет практически для каждого человека создать собственный банк линий СК. Так как эти клетки быстро размножаются, их можно получать в любом количестве. Человек, по существу, станет обладать неограниченным запасом собственных стволовых и прогениторных клеток различной детерминации.

e-mail: lm_chail@rambler.ru

Если основываться на современных представлениях об огромной роли в нормальном функционировании человеческого организма природного пула стволовых клеток, который резко беднеет с возрастом, то становятся совершенно очевидными колоссальные возможности терапевтического клонирования в поддержании и восстановлении здоровья человека в процессе его жизни, в преодолении различных недугов и в продлении его активного возраста [4]. Жизненные возможности каждого конкретного человека при этом резко обогащаются.

Сейчас в ряде стран приняты законы, разрешающие исследования с ЭСК человека, хотя морально-этические проблемы, связанные с использованием для этого человеческих эмбрионов, по-прежнему продолжают вызывать в обществе самые острые дебаты в истории биомедицинской науки [5]. Обычно в репродуктивной практике получают примерно 24 овоцита от каждой женщины-клиента и лишь два-четыре эмбриона используют затем для имплантации в надежде, что один из них будет нормально развиваться в ходе беременности. Многие эмбрионы, остающиеся после искусственного оплодотворения, будут разрушены в любом случае, даже спустя годы хранения в криобанках. Менее 3% таких эмбрионов доступны сейчас для исследований [6]. В то же время, специальный анализ, проведенный в США, Канаде, Англии, Австралии и в других странах показал, что пациенты центров репродукции в преобладающем большинстве предпочли бы передать остающиеся овоциты и эмбрионы в дар для научных исследований, в том числе и для получения СК [7–10].

Совсем недавно в марте 2009 г. в США были законодательно разрешены исследования с эмбрионами и ЭСК человека в биомедицинских целях с проведением соответствующих клинических испытаний [11], хотя, фактически, эксперименты в этом направлении были начаты в 2006 г. в Гарвардском университете. Многомиллионные проекты по созданию клонированных человеческих эмбрионов с целью получения ЭСК были запущены также и в Австралии. С учетом этих фактов нет никаких сомнений, что терапевтическое клонирование в ближайшее время станет ведущим направлением в заместительной клеточной терапии и биомедицинской практике в мире. Уникальная ценность ЭСК в лечебных целях определяет серьезную потребность в развитии терапевтического клонирования и в нашей стране. Очевидно, что законодательное разрешение в России на проведение таких научно-исследовательских работ в определенных жестких этических рамках является сейчас важнейшей и насущной потребностью. Необходимо заметить, что терапевтическое клонирование человека и репродуктивное клонирование это принципиально разные по своим целям направления, и, безусловно, репродуктивное клонирование человека должно быть под строгим запретом по фундаментальным биологическим причинам, не говоря уже о возникающих при этом сложных этических, правовых и социальных проблемах.

Мировые тенденции развития терапевтического клонирования

Огромные возможности технологий терапевтического клонирования пока продемонстрированы на животных модельных объектах. Первая работа по терапевтическому клонированию опубликована в 2000 г. и была выполнена на мышах [12]. В работе было показано, что линии ЭСК из клонированных эмбрионов состоят из клеток с такими же плюрипотентными свойствами, как и обычные ЭСК. Затем появились десятки таких работ и сделаны удачные попытки при использовании технологии клонирования корректировать имеющиеся у экспериментальных животных патологии, в частности, комбинированный иммунодефицит [13]. Тем самым были продемонстрированы серьезные возможности сочетания терапевтического клонирования с генной терапией для успешного лечения различных генетических заболеваний.

К настоящему времени фундаментально-научные и технологические аспекты не создают преград для терапевтического клонирования [14–17]. И хотя в мире насчитывается уже около 500 линий ЭСК человека, однако ни одна из них не получена технологиями клонирования – методом пересадки ядер. Две сенсационные публикации в журнале «Science» [18, 19] за 2004 г. и 2005 г. южнокорейских ученых по получению для 11 тяжело больных пациентов индивидуальных линий ЭСК, оказались недостоверными. Имеется сообщение [20] о получении пациент-специфичной линии из активированных партеногенетических человеческих овоцитов, содержащей гистосовместимые стволовые клетки для донора овоцитов – потенциальной пациентки, в лечении которой уже возможно использование аутогенных клеток без реакции иммунного отторжения. Другим достижением является получение клонированных человеческих эмбрионов с ядрами фибробластов, которые развились до стадии бластоцисты, но при этом линии ЭСК из них не создавали [21].

Альтернативные подходы в получении пациент-специфичных линий ЭСК

Одновременно в мире ведется интенсивный поиск альтернативных возможностей для получения пациент-специфичных линий ЭСК в биомедицинских целях. Одна из возможностей состоит в пересадке ядер соматических клеток человека в овоциты животных. Стремительно возросший интерес к терапевтическому клонированию в лечении различных заболеваний требует получения ЭСК в больших количествах. Однако, даже в условиях законодательного благоприятствования, человеческих овоцитов и зародышей для этого всегда будет очень ограниченное количество, а их получение – дорогостоящим. Нехватка человеческих овоцитов, необходимых в исследовательских целях, может быть восполнена использованием овоцитов животных, которые более доступны. Гибридные гетероплазмичные эмбрионы с геномом человека и смешанной цитоплазмой человека и животного представляют собой привлекательную и удобную модельную систему для решения многих фундаментально-практических вопросов терапевтического клонирования. При проведении исследований строго запрещено имплантировать полученные гибридные эмбрионы в матку человека или животного, а также длительно выращивать их *in vitro* (более 14 сут).

Первая успешная работа в этом направлении принадлежит группе китайских ученых [22], которые методом переноса ядер соматических клеток человека (фибробластов) в энуклеированные кроличьи овоциты получили гибридные реконструированные эмбрионы и затем линии ЭСК. Тщательный анализ показал, что эти ЭСК фенотипически сходны с обычными человеческими ЭСК, включая способность к разнообразным клеточным дифференцировкам. Таким образом, оказалось возможным получать линии стволовых клеток человека без участия человеческих овоцитов. Эти же исследователи затем осуществили перенос ядер фибробластов человека в энуклеированные коровьи овоциты [23] и показали,

что и в таких гибридах наблюдается перепрограммирование ядер клеток человека с соответствующей активацией эмбриональной генной экспрессии. Гибридные эмбрионы развивались до поздних предимплантационных стадий, что важно для генерации в дальнейшем ЭСК.

Проведение аналогичных исследований было разрешено в Англии, однако все усилия повторить работу китайских ученых оказались безуспешными: не удалось методом межвидовой пересадки ядер добиться развития таких же реконструированных гибридных эмбрионов человека и животных до стадии получения бластоцист и ЭСК [24, 25]. Аналогичные попытки межвидовой пересадки ядер человека, предпринятые в США, оказались тоже неудачными [26]. На основании большой серии опытов по переносу ядер соматических (кумулюсных) клеток человека в овоциты человека и различных животных: коров, кроликов и мышей, было показано, что в гибридах человека и животных не достигается соответствующего репрограммирования ядер, как в клонированных человеческих эмбрионах, у которых паттерн генной экспрессии был, практически, идентичен с нормальными человеческими эмбрионами. Особенно критично, что в гибридных эмбрионах отсутствовала экспрессия генов плюрипотентности, что необходимо для получения СК.

По мнению ряда исследователей, дефекты в развитии гибридов человека и животных могут быть связаны не только с недостаточным перепрограммированием эпигенетического статуса соматических ядер человека, но и с полной несовместимостью ядерного генома человека и митохондриального генома животного [27, 28]. Реконструированные гибридные зародыши выживают непродолжительное время только за счет человеческих митохондрий, поскольку ядра соматических клеток человека, как правило, переносятся в овоциты животного вместе с цитоплазмой [28]. Таким образом, на основании всех этих данных был сделан вывод, что овоциты животных не пригодны для использования в качестве реципиентов ядер человеческих клеток, и получение ЭСК человека из таких зародышей практически невозможно [26].

Другим подходом для создания пациент-специфичных плюрипотентных стволовых клеток является индукция дедифференцировки соматических клеток с помощью самих ЭСК, что было показано методом соматической гибридизации сначала на мышах [29, 30], а затем с ЭСК человека [31, 32]. Стволовые клетки при слиянии с соматическими клетками являются поставщиками факторов, требуемых для эпигенетического репрограммирования генома соматических клеток с соответствующей индукцией плюрипотентных свойств и характеристик [33, 34]. Показана возможность репрограммирования ядер соматических клеток с помощью экстракта ЭСК [35] и предприняты попытки селективной элиминации ЭСК-хромосом [36, 37], однако удаление всех хромосом технически пока мало достижимо, и рассматриваемый способ получения стволовых клеток в целом далек от выхода в терапевтическую практику.

Наиболее многообещающим альтернативным подходом для создания пациент-специфичных линий из соматических клеток в биомедицинских целях является получение ЭСК-подобных клеток или индуцированных плюрипотентных линий СК (iPS). Это новое направление исследований в заместительной клеточной терапии, начало которому положила работа ученых из Японии 2006 г. на мышах по перепрограммированию фибро-бластов до статуса, аналогичного плюрипотентному [38]. Вскоре была показана возможность такой трансформации для фибробластов человека [39]. Генетическую модификацию фибробластов проводили с помощью ретровирусной трансфекции четырех ключевых факторов плюрипотентности: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, и последующая экспрессия этих генов индуцировала репрограммирование соматических клеток с возвратом к плюрипотентному состоянию. Хотя эффективность такого подхода была очень низка, и известно также, что использование вирусных векторов может приводить к малигнизации iPS-клеток, эти работы стали сенсацией [40–42]. Последовала целая серия исследований с факторами индукции и был предпринят активный поиск других способов введения генов в соматические клетки (не прибегая к ретровирусам) с минимизацией модификации генома [43–48]. В результате на мышах была показана возможность безопасного способа репрограммирования клеток с использованием транспозонов и всего одного фактора Klf4 [49].

Тем не менее, iPS-клетки преждевременно считать адекватной альтернативной заменой ЭСК для регенеративной терапии [50]. В биомедицинских целях необходимо репрограммировать собственные гены клеток вместо добавления новых копий и только технологии терапевтического клонирования предоставляют уникальную возможность такого репрограммирования ядер соматических клеток. Обратимость программы экспрессии генов под воздействием цитоплазмы овоцитов, возврат к паттерну эмбриональной экспрессии в соматических донорских ядрах позволяет в настоящее время рассматривать реконструированные эмбрионы человека как основной источник получения пациент-специфичных линий ЭСК.

Состояние исследований по терапевтическому клонированию в России

Несмотря на бум по поводу больших возможностей ЭСК в лечении различных заболеваний, работы по терапевтическому клонированию в России пока практически не ведутся. В первую очередь это объясняется отсутствием законодательной базы для проведения исследований с использованием овоцитов и эмбрионов человека. С принятием таких законов для России существует реальная возможность очень быстрого развития терапевтического клонирования. В нашей стране имеются эффективные клеточные технологии получения реконструированных эмбрионов методом трансплантации ядер. По-существу, основы современных технологий переноса ядер соматических клеток, сочетающие микрохирургию и электрослияние были разработаны впервые у нас в 80-х годах прошлого столетия [51]. Также имеются эффективные технологии получения линий человеческих ЭСК [52].

Реализовывать задачи терапевтического клонирования возможно на основе центров репродукции, которые помимо их прямого предназначения, могут стать центрами по получению линий ЭСК, в первую очередь, непосредственно для женщин — пациенток данного центра и любых членов их семей. Можно ожидать, что с развитием терапевтических технологий получение собственных ЭСК станет доступно каждому человеку. Необходимо осуществлять тесное сотрудничество центров репродукции с соответствующими научно-исследовательскими лабораториями, ориентированными на решение фундаментальных проблем и на разработку новых технологий. К подобным технологиям можно отнести реконструкцию эмбрионов с применением неинвазивных оптико-лазерных приемов микроманипулирования в целях терапевтического клонирования и заместительной

клеточной терапии [53]. Разработка таких приемов приведет к появлению нового класса микроманипуляционной аппаратуры, совмещающей различные оптико-лазерные микроинструменты (оптический пинцет, лазерный скальпель и т.д.) с компьютеризированным управлением.

Следует ожидать, что при соответствующей последовательной направленной научно-организационной работе в отношении развития в нашей стране терапевтического клонирования, Россия может достичь в обозримом будущем зарубежного уровня в этой области биомедицинских исследований.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wilmut I., Schneider A.E., Chirr J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature. 1997; 385[6619]: 810–3.
2. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 282[5391]: 1145–7.
3. Shamblott M.J., Axelman J., Wang S. et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998; 95[23]: 13726–31.
4. He Q., Li J., Bettiol E., Jaconi M.E. Embryonic stem cells: new possible therapy for degenerative diseases that affect elderly people. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2003; 58[3]: 279–87.
5. de Wert G., Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. Hum. Reprod. 2003; 18[4]: 672–82.
6. Hoffman D. I., Zellman G.L., Fair C.C. et al. Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research. Fertil. Steril. 2003; 79[5]: 1063–9.
7. Lyerly A.D., Faden R.R. Embryonic stem cells. Willingness to donate frozen embryos for stem cell research. Science. 2007; 317[5834]: 46–7.
8. Nelson E., Mykitiuk R., Nisker J. et al. Informed consent to donate embryos for research purposes. J. Obstet. Gynaecol. Can. 2008; 30[9]: 824–36.
9. Hug K. Motivation to donate or not donate surplus embryos for stem-cell research: literature review. Fertil. Steril. 2008; 89[2]: 263–77.
10. Provoost V., Pennings G., De Sutter P. et al. Infertility patients' beliefs about their embryos and their disposition preferences. Hum. Reprod. 2009; 24[4]: 896–905.
11. Hayden E.C. Obama overturns stem-cell ban. President's executive order will allow US human embryonic stem-cell research to thrive at last. Nature. 2009; 458[7235]: 130.
12. Munsie M.J., Michalska A.E., O"Brien C.M. et al. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. Curr. Biol. 2000; 10[16]: 989–92.
13. Rideout W.M. 3rd, Hochedlinder K., Kyba M. et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. Cell. 2002; 109[1]: 17-27.
14. Wobus A M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol. Rev. 2005; 85[2]: 63578.
15. Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. Endocr. Rev. 2006; 27[2]: 208 – 19.
16. Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. N. Engl. J. of Med. 2003; 349[3]: 275–86.
17. Свиридова-Чайлахян Т.А., Чайлахян Л.М. Реконструкция зародышей мышей как адекватная модель для разработки основ терапевтического клонирования. ДАН. 2005; 404[3]: 422 – 4.
18. Hwang W.S., Ryu Y.J., Park J.H. et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. Science. 2004; 303[5664]: 1669–74.
19. Hwang W.S., Roh S.I., Lee B.C. et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. Science. 2005; 308[5755]: 1777–83.
20. Revazova E.S , Turovets N.A., Kochetkova O.D. et al. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. Cloning and Stem Cells. 2007; 9[3]: 432–9.
21. French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. et al. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. Stem Cells. 2008; 26[2]: 485–93.
22. Chen Y., He Z.X., Liu A. et al. Embryonic stem cell generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. Cell Res. 2003; 13[4]: 251–63.
23. Li F., Cao H., Zhang Q. et al. Activation of human embryonic gene expression in cytoplasmic hybrid embryos constructed between bovine oocytes and human fibroblasts. Cloning Stem Cells. 2008; 10[3]: 297–306.
24. Jingjuan, J., Tonghang, G., Xianhong, T. et al. Experimental cloning of embryos through human–rabbit interspecies nuclear transfer.Zool. Res. 2005; 26[4]: 416–21.
25. Vogel, G. Stem cells: ethical oocytes, available for a price. Science. 2006; 313[5784]: 155.
26. Chung Y., Bishop C.E., Treff N.R. et al. Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes. Cloning Stem Cells. 2009; 11[2]. In print. http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/clo.2009.0004.
27. John J.S., Lovell-Badge R. Human-animal cytoplasmic hybrid embryos, mitochondria, and an energetic debate. Nat. Cell Biol. 2007; 9[9]: 988–92.
28. Bowles E.J., Lee J.H., Alberio R. et al. Contrasting effects of in vitro fertilization and nuclear transfer on the expression of mtDNA replication factors. Genetics. 2007; 176[3]: 1511–26.
29. Miller R.A., Ruddle F.H. Pluripotent teratocarcinoma – thymus somatic cell hybrids. Cell. 1976; 9[1]: 45–55.
30. Tada M., Takahama Y., Abe K. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. Curr. Biol. 2001; 11[19]: 1553–8.
31. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science. 2005; 309[5739]: 1369–73.
32. Yu J., Vodyanik M.A., He P., Slukvin I.I., J.A. Thomson. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. Stem Cells. 2006; 24[1]: 168–76.
33. Do J.T., Scholer H.R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. Stem Cells. 2004; 22[6]:941–9.
34. Strelchenko N., Kukharenko V., Shkumatov A. et al. Reprogramming of human somatic cells by embryonic stem cell cytoplast. Reprod. Biomed. Online. 2006; 12[1]:107–11.
35. Taranger C.K., Noer A., Sorensen A.L. et al. Induction of dedifferentiation, genome-wide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. Mol. Biol. Cell. 2005; 16[12]: 5719–35.
36. Matsumura H., Tada M., Otsuji T. et al. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. Nat. Methods. 2007; 4[1]:23–5.
37. Matsumura H, Tada T. Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. Reprod. Biomed. Online. 2008; 16[1]: 51–6.
38. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006; 126[4]: 663–76.
39. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat. Biotechnol. 2008; 26[1]: 101–6.
40. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2007; 1[1]: 39–49.
41. Zaehres H., Schöler H.R. Induction of pluripotency: from mouse to human. Cell. 2007; 131[5]: 834–5.
42. Nishikawa S.I., Goldstein R.A., Nierras C.R. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008; 9[9]: 725–9.
43. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2008; 105[8]: 2883–8.
44. Park I.H., Zhao R., West J.A. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 2008; 451[7175]: 141–6.
45. Huangfu D., Osafune K., Maehr R. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Nat. Biotechnol. 2008; 26[11]: 1269–75.
46. Aasen T., Raya A., Barrero M.J. et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat. Biotechnol. 2008; 26[11]: 1276–84.
47. Kim J.B., Zaehres H., Wu G. et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature. 2008; 454[7204]: 646 – 50.
48. Feng B., Jiang J., Kraus P. et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. Nat. Cell Biol. 2009; 11[2]: 197 – 203.
49. Kaji K., Norrby K., Paca A. et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. Nature. 2009; In print. http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/abs/nature07864.html.
50. Liu S.V. iPS cells: a more critical review. Stem Cells Dev. 2008; 17[3]: 391–7.
51. Чайлахян Л.М., Свиридова-Чайлахян Т.А. Клеточная инженерия. Наука в России. 2001; 2: 10–5.
52. Киселев С.Л., Волчков П., Филоненко Е. и соавт. Молекулярная и клеточная биология линий эмбриональных стволовых клеток человека. Молекулярная медицина. 2006; 2: 6–11.
53. Karmenyan A., Shakhbazyan A., Sviridova-Chailakhyan T. et al. Set-up picosecond infrared laser for micromanipulation of early mammalian embryos. In: Inst. of Biophotonics, National Yang-Ming University, editors. LALS-2008. Proceedings of the International Conference on Laser Application in Life Sciences; 2008 Decemb 4-6; Taiwan, Taipei; 2008: 184.

Поступила 30.03.2009