

А. Ю. Петренко, Ю. А. Хунов, Э. Н. Иванов

**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ.
СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ
КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Монография

Луганск
«Пресс-экспресс»
2011

УДК 611.018.1
ББК 28.83
ПЗ0

Эта книга посвящается памяти выдающегося ученого и врача, академика Национальной академии наук Украины Валентина Ивановича Грищенко, внесшему неоценимый вклад в исследование и клиническое применение стволовых клеток.

Утверждено к печати решением Ученого совета Государственного учреждения «Луганский государственный медицинский университет» (протокол № 5 от 05.05.11)

Петренко А. Ю., Хунов Ю. А.
ПЗ0 Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения: монография/ А. Ю. Петренко, Ю. А. Хунов, Э. Н. Иванов. — Луганск: ООО «Пресс-экспресс», 2011. — 368 с.
ISBN 978-966-2327-11-3

В книге представлен анализ современных данных о молекулярных механизмах и регуляции деления и дифференцировки стволовых клеток. Приведены данные о роли стволовых клеток в развитии различных органов и тканей, а также об их вкладе в реализацию восстановительной регенерации при патологических процессах. Особое внимание уделяется уникальным свойствам стволовых клеток различного происхождения и их терапевтическому потенциалу.

Книга рассчитана на студентов и широкий круг специалистов медико-биологического профиля.

УДК 611.018.1
ББК 28.83

ISBN 978-966-2327-11-3

© Петренко А. Ю., Хунов Ю. А., 2011

ОТ АВТОРОВ

Свойства и терапевтический потенциал стволовых клеток (СК) различного происхождения представляют большой интерес для специалистов широкого профиля. Учитывая заинтересованность научной общественности проблемами биологии авторы провели анализ собственных и литературных данных по этим кардинальным вопросам биологии стволовых клеток.

Книга состоит из двух частей. В первой части представлены характеристика и основные свойства существующих на сегодняшний день СК (эмбриональных, зародышевых, региональных, индуцированных плюрипотентных). Во второй части суммированы данные, полученные при изучении восстановительного и дифференцировочного потенциала региональных СК различных органов и тканей. Монография представляет собой современный срез знаний, посвящённых стволовым клеткам. Эта проблема приобретает большое значение в связи с перспективой широкого применения аутологичных СК в регенеративной медицине и тканевой инженерии.

Монография рассчитана на широкий круг специалистов в области клеточной биологии, физиологии, трансплантологии, врачей различных специальностей.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	9
ЧАСТЬ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА И СВОЙСТВА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК	12
Глава 1. Эмбриональные стволовые клетки	12
1.1. Гистогенез и регуляция плюрипотентности у эмбриона	12
1.2. Фенотипическая характеристика ЭСК	14
1.3. Получение и культивирование ЭСК	14
1.4. Экспансия ЭСК	16
1.5. Плюрипотентность ЭСК	19
1.6. Перспективы использования ЭСК в биологии и медицине	23
1.6.1. ЭСК как клетки выбора в лечении заболеваний человека	23
1.6.2. Дифференцировка ЭСК в кардиомиоциты	24
1.6.3. Дифференцировка ЭСК в кроветворные клетки	24
1.6.4. Дифференцировка ЭСК в клетки ЦНС	25
1.6.5. Изучение эмбриогенеза с помощью эмбриональных стволовых клеток	26
Глава 2. Региональные стволовые клетки	28
2.1. Общая характеристика региональных стволовых клеток	28
2.2. Нейральные стволовые клетки	29
2.3. Гемопоэтические стволовые клетки из различных источников	30
2.4. Мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки из различных источников	34
2.4.1. Фенотип МСК	36
2.4.2. Ортодоксальная дифференцировка МСК	39
2.4.3. Источники МСК	40
2.4.4. Генетическая регуляция дифференцировки МСК в мезодермальные фенотипы	44
2.4.5. Перициты	47
Глава 3. Роль теломеров в биологии стволовой клетки	52
3.1. Организация и функция теломеров	52
3.2. Потеря теломеров и ее значение	53
3.3. Механизмы потери теломеров	53
3.4. Теломеразы и ее роль в биологии	54
3.5. Регуляторная роль теломеров в биологии соматических клеток	55
Глава 4. Регуляторные пути развития стволовых клеток	57
4.1. Внешние факторы, влияющие на свойства стволовых клеток	57
4.1.1. LIF (leukemia inhibitory factor)	57
4.1.2. bFGF (basic fibroblast growth factor)	57
4.2. Внутренние факторы, влияющие на свойства стволовых клеток	58
4.2.1. Фактор транскрипции Oct3/4	58
4.2.2. Сигнальная система Hedgehog	58
4.2.3. Сигнальная система Notch	59
4.2.4. Фактор транскрипции Sox2	61
4.2.5. Сигнальная система Wnt/ β -катенин	61
4.2.6. Регуляторный фактор Bmi-1	63
4.2.7. Фактор транскрипции Nanog	63
4.2.8. Регуляторные функции костных морфогенетических белков	64
4.2.9. Микрорибонуклеиновые кислоты	64
4.3. Взаимодействие путей самообновления стволовых клеток	64
4.4. Стволовые клетки и рак	64

Глава 5. Молекулярно-генетические механизмы дифференцировки.	69
5.1. Классический иерархический путь развития	69
5.2. Рестрикция генной экспрессии	69
5.3. Обратимость генных рестрикций.	70
5.4. Стохастичность и детерминизм в поведении клетки	71
5.5. Теория сложности и возникновение клеточных феноменов	71
Глава 6. Экспансия региональных стволовых клеток	73
6.1. Асимметричное клеточное деление региональных стволовых клеток	73
6.2. Генетические регуляторы асимметричного клеточного деления	75
6.3. Наследование детерминант асимметричного клеточного деления.	77
6.4. Роль внешних факторов в реализации асимметричного клеточного деления.	78
Глава 7. Пластичность региональных стволовых клеток	80
7.1. Сущность и проявления пластичности стволовых клеток.	80
7.2. Трансдифференцировка клеток как основа пластичности	86
7.2.1. Методология определения проявлений трансдифференцировки	88
7.2.2. Механизмы трансдифференцировки.	90
7.3. Слияние клеток как основа пластичности.	93
7.4. Гетерогенность региональных стволовых клеток как основа проявляющейся пластичности.	99
7.5. Анализ механизмов пластичности.	102
Глава 8. Индукция плюрипотентных свойств у дифференцированных клеток	111
8.1. Трансдифференцировка соматических клеток <i>ex vivo</i> и при трансплантации	111
8.2. Эпигенетическое перепрограммирование клеток	112
8.2.1. Перепрограммирование ядер бесклеточными экстрактами	112
8.2.2. Перепрограммирование клеток животных путем переноса ядра.	113
8.2.3. Перепрограммирование путем слияния дифференцированных клеток с ЭСК или ЭЗК.	115
8.3. Молекулярные механизмы перепрограммирования клеток	116
8.4. Контроль транскрипции в регуляции экспрессии генов	120
8.5. Индукция плюрипотентности в дифференцированных клетках	122
8.5.1. Предполагаемый механизм действия факторов транскрипции в индукции плюрипотентности соматических клеток	127
8.5.2. Перспективы применения индуцируемых плюрипотентных клеток	128
ЧАСТЬ 2. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ	132
Глава 9. Стволовые клетки сперматогенной системы.	132
Глава 10. Стволовые клетки центральной и периферической нервной системы	138
10.1. Роль стволовых клеток в развитии центральной нервной системы	138
10.2. Нейрогенез в ЦНС взрослых млекопитающих.	139
10.3. Пролиферация и дифференцировка нейральных стволовых клеток	142
10.4. Ниша нейральных стволовых клеток.	144
10.5. Пластичность нейральных стволовых клеток.	146
10.6. Трансплантация НСК животным с повреждениями головного или спинного мозга	147
10.7. Проблемы восстановления нервной функции при нейродегенеративных заболеваниях.	148
10.8. Активация резидентных стволовых клеток мозга для лечения нейродегенеративных заболеваний.	150
Глава 11. Стволовые клетки органов зрения и слуха	157
11.1. Стволовые клетки глаза.	157
11.1.1. Формирование тканей глазного пузыря	157
11.1.2. Стволовые клетки сетчатки	157

11.1.3. Стволовые клетки пигментного слоя сетчатки	158
11.1.4. Стволовые клетки роговицы, склеры и сосудистой оболочки	159
11.1.5. От экспериментальной трансплантации сетчатки к трансплантации стволовых клеток	161
11.2. Органы чувств: ухо	162
11.2.1. Волосковые клетки сенсорного эпителия внутреннего уха как мишень патологического и терапевтического воздействия	162
11.2.2. Перспективы образования клеток внутреннего уха из экзогенных стволовых клеток	163
11.2.3. Стволовые клетки внутреннего уха	165
Глава 12. Эпидермальные стволовые клетки	170
12.1. Локализация стволовых клеток эпидермиса	170
12.2. Маркеры стволовых клеток эпидермиса	173
12.3. Мультипотентный потенциал стволовых клеток эпителия кожи	174
12.4. Регуляция судьбы стволовых клеток эпидермиса	175
Глава 13. Стволовые клетки в генезе и реализации функциональных свойств некоторых желез.	179
13.1. Молочная железа	179
13.2. Предстательная железа	179
13.3. Гипофиз.	183
13.4. Щитовидная железа	184
Глава 14. Стволовые клетки костного мозга	189
14.1. Костный мозг и гемопоэз	189
14.1.1. Гемопоэтические стволовые клетки	189
14.1.2. Маркеры гемопоэтических стволовых клеток	190
14.1.3. Регуляция дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток костного мозга.	192
14.1.4. Потенциал дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток	193
14.2. Строма костного мозга	194
14.2.1. Формирование микроокружения ГСК клетками стромы костного мозга	195
14.2.2. Популяции стволовых клеток стромы костного мозга	197
14.2.3. Критерии стандартизации препаратов МСК человека	201
14.2.4. Терапевтический потенциал мезенхимальных стромальных клеток костного мозга	202
Глава 15. Эндотелиальные прогениторные клетки	207
15.1. Свойства эндотелиальных прогениторных клеток	207
15.2. Роль эндотелиальных прогениторных клеток в морфогенезе кровеносных сосудов	208
15.3. Роль ангиогенных факторов в неоваскуляризации.	210
Глава 16. Клетки стромально-васкулярной фракции жировой ткани.	213
16.1. Выделение стромальных клеток жировой ткани	213
16.2. Иммунофенотип стромальных клеток жировой ткани	214
16.3. Дифференцировочный потенциал мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани	217
16.3.1. Дифференцировка СКЖТ в мезодермальные линии.	217
16.3.2. Дифференцировка СКЖТ в эктодермальные линии	221
16.3.3. Дифференцировка СКЖТ в гепатоциты	221
16.4. Перспективы клинического применения стволовых клеток жировой ткани.	221
Глава 17. Актуальные проблемы клеточной терапии сердца	224
17.1. Кардиогенез человека	225
17.2. Стволовые клетки сердца в норме и при патологии.	225
17.3. ЭСК и клетки плодов в перспективе клеточной терапии сердца	227
17.4. Перспективы применения предшественников миоцитов в клеточной терапии сердца	228

17.5. Мезенхимальные стромальные клетки в клеточной терапии сердца	229
17.6. Дифференцировка гемопоэтических стволовых клеток в клетки сердца и сосудов	231
17.7. Перспективы развития клеточной терапии в клинике сердечно-сосудистых заболеваний	233
Глава 18. Стволовые клетки в развитии и регенерации скелетных мышц	239
18.1. Регенерация скелетных мышц	239
18.2. Развитие скелетных мышц	240
18.3. Стволовые клетки скелетных мышц	240
18.4. Миогенные клетки, локализованные вне мышечных волокон	241
18.5. Перспективы клеточной терапии мышечных заболеваний	245
Глава 19. От мезенхимальной стволовой клетки до пространственной организации костной ткани	248
19.1. Мезенхимальная стволовая клетка как исходная клетка остеопоза	248
19.2. Остеопрогениторные клетки	248
19.3. Преостеобласты	250
19.4. Механизмы регуляции развития кости	250
19.5. Развитие пространственной структуры костной ткани	251
19.6. Клеточная терапия заболеваний костной системы.	251
Глава 20. Стволовые клетки в развитии и тканевой инженерии хрящевой ткани, сухожилий и связок.	254
20.1. Развитие и свойства хрящевой ткани.	254
20.2. Некоторые особенности сухожилий и связок	258
Глава 21. Свойства стволовых клеток молочных и постоянных зубов	261
21.1. Стволовые клетки молочных зубов	261
21.2. Стволовые клетки постоянных зубов	261
Глава 22. Роль стволовых клеток в развитии и ремоделировании почек при патологии	266
22.1. Участие стволовых клеток в развитии почек	266
22.2. Ремоделирование почки при почечной недостаточности	266
22.3. Возможность терапевтического применения стволовых клеток при заболеваниях почек	268
Глава 23. Стволовые клетки в развитии, регенерации и терапии печени.	271
23.1. Участие стволовых клеток в развитии печени	271
23.2. Резидентные стволовые клетки печени взрослых млекопитающих.	275
23.2.1. Дифференцированные гепатоциты и регенерация печени	275
23.2.2. Овальные клетки как стволовые клетки печени	277
23.2.3. Гепатические стволовые клетки	279
23.3. Образование клеток печени из внегепатических стволовых клеток	280
23.3.1. Дифференцировка стволовых клеток костного мозга в клетки печени.	280
23.3.2. Плюрипотентные стволовые клетки и образование клеток печени.	282
Глава 24. Претенденты на стволовые клетки легких	288
24.1. Клеточный состав легких	288
24.2. Дифференцировка клеток костного мозга в клетки легких	290
24.3. Перспективы применения стволовых клеток в терапии легочных заболеваний	293
Глава 25. Поджелудочная железа и перспективы применения стволовых клеток для лечения инсулинзависимого сахарного диабета	295
25.1. Гистогенез поджелудочной железы	295
25.2. Регенерация островков поджелудочной железы.	296
25.3. Дифференцировка ЭСК в эндокринные клетки поджелудочной железы.	300
25.4. Дифференцировка клеток печени и эпителия кишечника в клетки поджелудочной железы.	301

25.5. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в β -клетки поджелудочной железы. . . .	302
25.6. Пластичность клеток поджелудочной железы	304
25.7. Клеточная терапия сахарного диабета в эксперименте и клинике	305
Глава 26. Стволовые клетки желудочно-кишечного тракта	312
26.1. Стволовые клетки пищевода и желудка	312
26.2. Стволовые клетки тонкого и толстого кишечника	313
26.3. Дифференцировка региональных СК других тканей в клетки желудочно-кишечного тракта . . .	316
Заключение.	318
Глоссарий	321
Список сокращений	325
Сводный указатель литературы	326

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые клетки (СК) являются самыми ранними типами клеток в последовательной цепи строго отрегулированных процессов, обеспечивающих образование и поддержание большинства клеточных линий взрослого человека. Эти процессы включают пролиферацию клеток, их миграцию, дифференцировку, созревание и апоптоз. Будучи прародителями (предшественниками) всех тканей организма, СК отличаются способностью существовать *in vivo* в недифференцированном состоянии и самообновляться. По укоренившемуся мнению, для того, чтобы признать клетку стволовой, она должна соответствовать 4-м критериям [60]: во-первых, быть способной к осуществлению множественных последовательных делений, являющихся необходимым условием для сохранения популяции, оставаясь при этом морфологически и функционально неспециализированной (незрелой); во-вторых, немногочисленные дочерние клетки, происходящие из СК, должны обладать способностью к дифференцировке более чем в один клеточный тип; в-третьих, при трансплантации поврежденному реципиенту СК должны репопулировать ту ткань, из которой они произошли, и обеспечивать ее функцию; и, наконец, в-четвертых, *in vivo* СК должны содействовать развитию своего дифференцированного потомства даже при отсутствии повреждения ткани, которую это потомство пополняет. В качестве наиболее ярких примеров СК можно привести гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), дифференцирующиеся во все линии клеток крови; нейральные СК (НСК), образующие нейроны, астроциты и олигодендроциты; мезенхимальные СК (МСК), обеспечивающие образование фибробластов, остеобластов, хондробластов, адипоцитов и клеток, поддерживающих кроветворение. У взрослых некоторые СК могут вызывать образование зрелых клеток только одного типа, как, например, СК тучных клеток [265] или СК кератиноцитов [635].

Из всего разнообразия СК организма млекопитающих, в том числе человека, выделяются эмбриональные СК (ЭСК), происходящие из единичных бластомеров, внутренней клеточной массы бластоцисты (ВМБ), эпибласта, морулы, а также из зародышевых клеток, т. е. из популяций, которые возникают еще до появления специфических тканей. Эти СК не имеют ограничений в программе развития, способны дифференцироваться в любые производные всех трех зародышевых листков (экто-, мезо- и энтодермы) и отличаются высокой подвижностью. Но термин «эмбриональная СК», применяемый без каких-либо пояснений, может создать превратное представление, что все СК эмбриона обладают неограниченной способностью к дифференцировке. На самом деле это касается СК, происходящих только из вышеназванных источников. Все остальные СК не имеют пока общепринятого названия, и в разных работах их называют региональными, резервными, соматическими или взрослыми. Каждый из этих терминов имеет свои преимущества и недостатки. Учитывая, что СК этой группы обычно образуют потомки, дифференцирующиеся в клетки того региона (органа, ткани), из которого они были выделены, в данной работе мы остановились на термине «региональные СК».

Появление в конце XX века плюрипотентных линий ЭСК человека [742, 743] представляло кульминацию исследований, проводившихся почти столетия, — исследований, которые начинались с изучения причин возникновения тератокарцином (опухолей, происходящих из гонад мышей) и ознаменовались прояснением ряда вопросов развития млекопитающих и лечения бесплодия [582–584, 628]. Но получение линий СК человека привело к возникновению интенсивных общественных дебатов, касающихся этики использования эмбрионов для таких целей. Итогом дебатов стало распространение в большинстве стран мнения, что СК дадут возможность изменить многие подходы к изучению биологии человека и в лечении заболеваний. В результате, теперь отмечается все возрастающая общественная поддержка исследований СК, и во многих странах заложена легальная и регулируемая основа для проведения таких работ. Несмотря на все это возбуждение, справедливо будет отметить, что наука о мультипотентных СК находится еще в начале своего развития. Хотя СК мышей описаны более 20 лет назад, большинство исследователей долгое время применяли эти клетки только для изучения функции генов. Лишь

в последние годы, уже после клонирования млекопитающих и получения линий ЭСК человека происходит переключение интенсивности исследовательских усилий на изучение природы СК и контроля их дифференцировки.

Дифференцировочный потенциал — это тот критерий, который позволяет сравнивать СК, полученные из разных источников и в разные периоды развития. На основе этого потенциала Wagers & Weissman [772] предложили свою классификацию СК. Графическая схема этой классификации представлена на рис. 1. Как видно из него, дифференцировочные возможности различных СК варьируют от тотипотентных, позволяющих образовать все возможные типы клеток, и плюрипотентных, позволяющих образовать клетки всех трех зародышевых листков, к мультипотентным, олигопотентным и даже унипотентным.

При помещении тотипотентной клетки (зиготы, blastomeres) в матку должен развиваться полноценный плод. Но при подсадке в матку плюрипотентных ЭСК или ЭЗК организм развиваться не будет, поскольку эти клетки не дифференцируются в клетки тканей, поддерживающих развитие эмбриона.

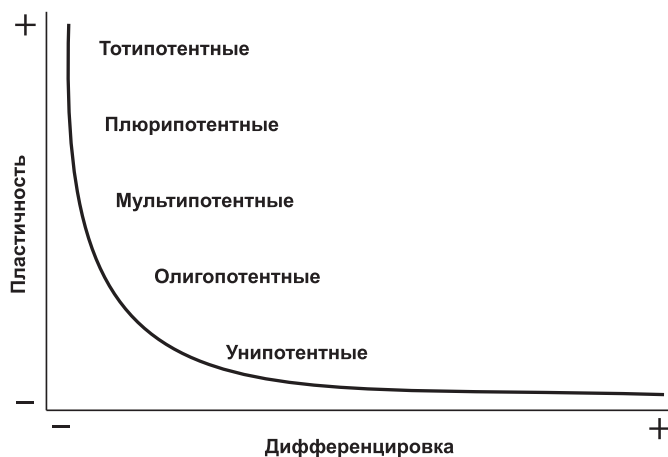


Рис. 1. Классификации стволовых клеток на основе дифференцировочного потенциала

Классификация основана на потенциале развития СК и представлена Wagers and Weissman [772]. Тотипотентные СК способны образовать все эмбриональные и внеэмбриональные типы клеток; плюрипотентные — могут образовать все типы клеток организма; мультипотентные — образуют несколько клеточных линий; олигопотентные — способны образовать ограниченное число клеточных линий; унипотентные — образуют только один тип зрелых клеток.

В настоящее время отмечается повышенное внимание общества к СК и их терапевтическим возможностям. Изучение биологии СК превратилось в отдельную и специализированную область исследований, ежемесячно приносящую огромное количество новых данных. Эти сведения необходимо подвергать обобщению и систематизации как для констатации и усвоения выявленных закономерностей, так и для приближения возможности использования новых данных в клинике на научнообоснованной и этически приемлемой основе. Авторы поставили своей целью проанализировать работы последних лет по свойствам и потенциалу клинического применения СК. Если на основании обобщенных данных удастся расширить и углубить научные представления у всех, кто интересуется этой проблемой, авторы будут считать свою задачу выполненной.

Таблица 1

Классификация стволовых клеток на основе дифференцировочного потенциала

Потенциал дифференцировки	Число типов клеток	Примеры	Типы клеток после дифференцировки	Источник
Тотипотентные	Все	Зигота, бластомеры	Все возможные типы клеток организма	[584]
Плюрипотентные	Все, кроме клеток трофобласта	ЭСК ЭЗК	Все клетки трех зародышевых листков	[334, 446]
Мультипотентные	Много	ГСК	Все клетки крови	[516]
Олигопотентные	Несколько	Миелоидная про-гениторная клетка	Моноциты, макрофаги, эозинофилы, нейтрофилы, эритроциты	
Квадрипотентные	4	МСК	Хондроциты, остециты, адипоциты, миоциты	[186, 188, 585]
Трипотентные	3	НСК	Нейроны, астроциты, олигодендроциты	[157]
Бипотентные	2	Гепатобласт	Гепатоцит, холангиоцит	[686]
Унипотентные	1	СК тучных клеток, СК кератиноцитов	Тучная клетка, кератиноцит	[265, 635]

ЧАСТЬ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА И СВОЙСТВА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ГЛАВА 1. ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

1.1. Гистогенез и регуляция плюрипотентности у эмбриона

Оплодотворение запускает первое клеточное деление зародыша. У человека на стадии 4–8 клеток геном эмбриона подвергается активации. В результате ее происходит уплотнение зародышевого пузырька (бластоцисты) и образование его наружного слоя — трофобластической оболочки (рис. 1.1). Небольшой группе клеток внутри бластоцисты, получившей название — внутренняя масса бластоцисты (ВМБ), предназначено образовать все ткани организма. Из ВМБ через 4–5 дней после оплодотворения перед имплантацией яйцеклетки в стенку матки можно выделить плюрипотентные СК, способные к образованию всех тканей организма, а также многих, но не всех, клеток, поддерживающих беременность. Однако они уже не способны из себя образовать новую особь и этим отличаются от тотипотентных клеток. Последние, следовательно, можно определить как клетки, способные при соответствующей материнской поддержки к образованию новой особи. Такие клетки у мыши во время развития сохраняются только до 8-клеточной стадии деления зиготы [582].

Следующим важным результатом дифференцировки клеток зародыша является образование клеток примитивной энтодермы (предшественников желточного мешка), которое происходит близко ко времени имплантации — прикрепления зародыша к стенке матки (у человека — на 5–7-й день беременности). Желточный мешок, представляющий примитивную форму плаценты, имеет большое значение в поглощении и обработке питательных веществ до развития хориоаллантоисной плаценты. В последние годы установлено, что желточный мешок и другие внеэмбриональные ткани, которые соседствуют с плюрипотентными СК, играют ключевую роль в выработке молекул, определяющих судьбу клеток внутри самого эмбриона. Сигналы из этих внеэмбриональных тканей помогают управлять клетками внутри плюрипотентной ткани, теперь принимающей форму клеточного пласта, известного как эпибласт, или примитивная эктодерма (рис. 1.1). В результате этих событий происходит постепенное снижение дифференцировочного потенциала у клеток эпибласта. Исключение из этого правила представляют клетки зародышевой линии, которые до середины гестации не подвергаются половой дифференцировке и сохраняют плюрипотентность [582].

ЭСК определяются как плюрипотентные клетки на основании их способности образовывать при надлежащих условиях культивирования все ткани за исключением трофобластической оболочки [46]. В последние годы получен ряд интересных данных, проясняющих молекулярную основу регуляции плюрипотентности в эмбрионе. Была идентифицирована большая группа генов, существенных для развития плюрипотентных клеток. В эту группу входят гены белков, контролирующих тотипотентность генома ЭСК (*Oct4*, *Otx1*, *Otx2*), белков-контролеров тотипотентности СК (*Sox-1*, *Sox-2*, *Sox-3*, *Zic-1*, *Zic-2*, *Zic-3*, *Xash-3*, *Xbdx*), сигналов пролиферации (*Wnt-1*, *Wnt-2*), контролеров закладки органов и маркеров оценки эффективности дифференцировки (*FoxD3*, *taube nuss* и др.) [25, 208, 537, 675]. Известно, например, что надлежащее развитие ВМБ решающим образом зависит от представленности гена *taube nuss*. При его умеренной сверхэкспрессии выявляют дифференцировку во внеэмбриональной энтодерме, тогда как при недостаточной экспрессии гена *taube nuss* дифференцировка происходит только в трофобластической оболочке [770].

Ключевым маркером плюрипотентных клеток интактного эмбриона и ЭСК является фактор транскрипции *Oct3/4*. Для того чтобы ЭСК оставались недифференцированными, экспрессия *Oct3/4* не должна снижаться ниже критического уровня [540]. Однако экспрессии одного *Oct3/4* недостаточно, чтобы сохранить такое состояние ЭСК. Было установлено, что для ЭСК мыши существенное значение имеет фактор транскрипции *Nanog* [143, 540]. При дифференцировке

мышинных ЭСК экспрессия *Nanog* быстро снижается, но если этот ген сохраняется, например, благодаря врожденному промотору, ЭСК мыши остаются недифференцированными и могут пролиферировать в бессывороточной среде даже при отсутствии ростовых факторов [825]. В ЭСК человека *Nanog* также выявляется, но на более низком уровне и его функция в этих клетках еще недостаточно изучена.

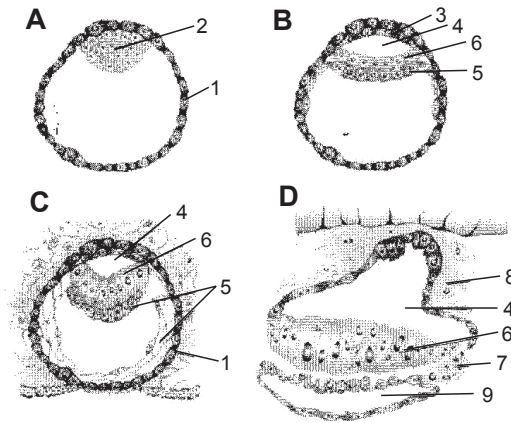


Рис. 1.1. Схема пред- и раннего постимплантационного развития приматов

(А) Стадия бластоцисты эмбриона, показывающая образование трофобласта (1) и ВМБ (2); (В) 9-й постимплантационный день эмбриона макаки резус. Показано образование амниона (3), амниотической полости (4), гипобласта (5) и эпибласта (6); (С) 10,5-й постимплантационный день эмбриона человека. Отмечается характерное покрытие полости бластоцисты сетью внеэмбриональной эндодермы (клетками гипобласта (5)); (D) 13-й день эмбриона макаки резус. Отмечено образование первичной полоски (7) из каудальной части нижнего (хвостового) эпибласта, следующее за интенсивным развитием внеэмбриональной мезодермы (8). Видны также амниотическая полость (4) и вторичный желточный мешок (9).

При сравнении экспрессии генов в ЭСК различных линий, эмбриональных клетках карциномы (ЕС клетках), региональных стволовых и дифференцированных клетках человека Sparger и др. [707] выявили 895 генов, которые в ЭСК и клетках карциномы представлены на значительно более высоких уровнях. По данным Sato и др. [663], насчитывается 918 генов, которые в недифференцированных ЭСК человека экспрессируются чаще, чем у дифференцированных потомков этих клеток. Еще одной группой исследователей [88] были названы 92 гена, включая *Oct3/4* и *Nanog*, которыми были обогащены линейные ЭСК человека. В ЭСК мышей был обнаружен специфический ген *Esg-1*, который связан исключительно с плюрипотентностью [Tanaka et al., 2002].

Неоценимый вклад в выяснение механизма регуляции плюрипотентности внесли недавние работы в области эпигенетического репрограммирования японских ученых Кадзутоси Такахаши из Университета Киото и Шиния Яманака из Японского Агентства по науке и технологии. Вначале эти исследователи отобрали 24 гена, высокая экспрессия которых характерна для ЭСК, и методом вирусной трансдукции ввели их во взрослые клетки (фибробласты) мышей [723]. В ходе культивирования таких генетически модифицированных фибробластов были получены ЭСК-подобные колонии. Затем для выяснения значения отдельных кандидатов было проведено последовательное выведение индивидуальных генов. В результате авторам удалось показать, что сочетания только четырех генов — *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* — достаточно для образования колоний, проявляющих морфологию и показатели роста, характерные для ЭСК, и экспрессирующих соответствующие генетические маркеры. Подкожная инъекция полученных клеток мышам приводила к образованию тератом, содержащих дифференцированные клетки всех трех зародышевых листков, а их

введение в бластоцисты позволило получить химерных мышей. Неожданным результатом работы по селекции минимальной комбинации генов явилась необязательность наличия в ней Nanog.

В следующей своей работе [722] авторы показали, что введение тех же генов (Oct3/4, Sox2, c-Мус и Klf4) в фибробласты взрослого человека также позволяет получить клетки с плюрипотентными свойствами; эти клетки образовывали характерные колонии, несли набор поверхностных антигенов, экспрессировали специфические гены и обладали высокой активностью теломеразы. Более того, полученные клетки были способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков не только при образовании тератомы, но и в условиях нормального роста в культуре. Исследования в данном направлении начались только недавно, но уже не вызывает сомнений, что плюрипотентные СК можно получить из дифференцированных соматических клеток животных и человека путем введения в эти клетки дополнительных копий всего нескольких специфических генов (подробнее см. главу 8).

1.2. Фенотипическая характеристика ЭСК

ЭСК человека характеризуют поверхностные гликолипидные стадиеспецифические эмбриональные антигены 3 и 4 (SSEA-3 и SSEA-4), функциональное значение которых неизвестно, и высокомолекулярные гликопротеиновые антигены TRA-1-60 и TRA-1-81. С помощью ПЦР в ЭСК выявляется экспрессия таких факторов транскрипции, как Oct3/4, FoxD3 [540], Rex-1 [84] и др., которые необходимы для сохранения недифференцированного фенотипа и имеют большое значение в определении ранних этапов эмбриогенеза и дифференцировки [675]. Дополнительной характеристикой недифференцированных ЭСК является экспрессия высоких уровней щелочной фосфатазы (ЩФ) на поверхности клеток. Дифференцировка ЭСК сопровождается снижением уровней SSEA-3 и SSEA-4, повышением содержания SSEA-1 и снижением экспрессии OCT3/4 и ЩФ. Ни один из антигенов ЭСК не присущ только плюрипотентным клеткам. Они обнаруживаются также в других клетках организма [11]. ЭСК могут пролиферировать в культуре в течение многих лет и сохраняют при этом нормальный кариотип [742, 743].

1.3. Получение и культивирование ЭСК

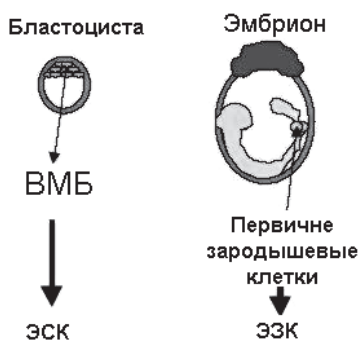


Рис. 1.2. Источники получения стволовых плюрипотентных клеток

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и эмбриональные зародышевые клетки (ЭЗК) получают соответственно из культивированных *in vitro* клеток внутренней массы бластоцисты (ВМБ) первых 5–7 дней после оплодотворения и из первичных зародышевых клеток, выделенных из половых бугорков плодов 5–7 недель гестации.

Оптимальными источниками ЭСК человека являются бластоцисты 5-го дня развития [742] и первичные зародышевые клетки, выделяемые из половых бугорков 5–9-недельных эмбрионов (рис. 1.2) [582, 584]. Именно из таких клеток происходят клонированные линии ЭСК челове-

ка H9.1, H9.2 и др. Клетки этих линий сохраняют все свойства родительских клеток, включая способность к образованию *in vivo* тератом*, содержащих производные всех трех зародышевых листков. Кроме названных источников, описано получение ЭСК человека из единичных бластомеров [387], клеток эпибласта [122, 732], морулы — более поздней стадии бластоцисты [712], и клеток партеногенетических эмбрионов [473]. Эпибластные СК, или Epi-ЭСК, выделенные из постимплантационных эмбрионов мышей (E 5.5 — E 6.5), значительно отличаются от ЭСК мышей и обладают некоторыми свойствами ЭСК человека [122, 732]. В частности, получить Epi-ЭСК с применением LIF и/или BMP4 не удастся. Основную роль в получении Epi-ЭСК, также как ЭСК человека, имеют FGF и сигнальная система активин/Nodal. Экспрессия генов Epi-ЭСК отражает постимплантационное эпибластное происхождение этих клеток, и этим они отличаются от ЭСК мышей. Но Epi-ЭСК обладают двумя основными свойствами ЭСК: длительной пролиферацией *in vitro* и мультилинейной дифференцировкой.

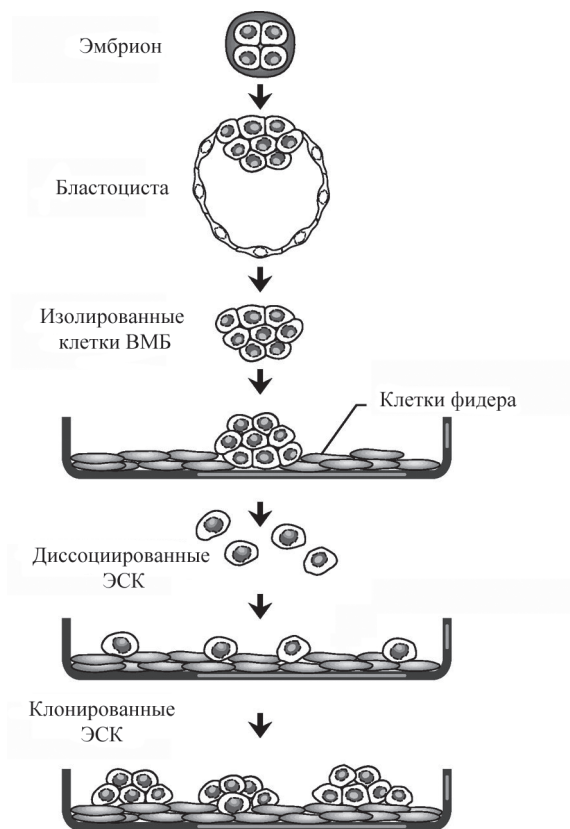


Рис. 1.3. Получение линий ЭСК человека

Клетки внутренней массы бластоцисты отделяют от трофобластической оболочки иммунохирургической манипуляцией, помещают на питательный слой из фибробластов и культивируют в среде, содержащей эмбриональную сыворотку. Выросшие колонии подвергаются размножению и клонированию.

Выделение ВМБ человека проводят таким же методом, как получение этих клеток у приматов (рис. 1.3). Вначале добываются отделения ВМБ от клеток трофобластической оболочки. Для этого ис-

* Тератомы, развивающиеся из ЭСК человека, часто отличаются доброкачественностью и не содержат недифференцированных СК со свойствами клеток эмбриональной карциномы или злокачественных производных другой недифференцированной ткани [582]. В этом отношении ЭСК человека отличаются от ЭСК мыши, так как тератомы, развивающиеся из ЭСК мыши, всегда содержат, кроме дифференцированных клеток, недифференцированные злокачественные клетки.

пользуют опосредованную комплементом деструкцию клеток трофобласта, применяя антитела, связывающиеся с последними, но оставляющие неповрежденными клетки ВМБ. Выделенную ВМБ, состоящую на данной стадии из 30–35 клеток, подвергают далее выращиванию в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку (ФТС), на питающем (фидерном) слое мышинных фибробластов или соматических клеток человека, подвергнутых митотической инактивации гамма-облучением (5000 рад). ЭСК из ВМБ человека в процессе культивирования образуют довольно плоские, компактные колонии, которые легко распадаются на отдельные клетки при обработке трипсином или суспендировании в среде без Ca^{++} и Mg^{++} [59]. ЭСК образуют плотные сфероподобные колонии, устойчивые к стандартным методам диссоциации [548]. Время удвоения популяции ЭСК человека — 36 ч. [59].

К 2006 году во всем мире было создано подобным образом более 120 линий ЭСК человека, из которых 67 линий были включены в реестр Национальных институтов здравоохранения США [832, 833]. Инициативная группа исследователей в 2007 г. охарактеризовала 59 линий ЭСК человека, полученных в 17 лабораториях 11 стран [339]. В процессе этой работы было констатировано наличие ряда свойств, присущих всем исследованным линиям. Среди этих свойств экспрессия характерных белков клеточной поверхности, представленность генов плюрипотентности, включающих *Oct-3/4*, *Nanog* и *Sox2*, и способность дифференцироваться в клеточные типы, образующиеся из всех трех зародышевых листков. Но были выявлены также различия, не поддающиеся пока объяснению. Так, некоторые линии ЭСК человека, полученные в сходных условиях, отличались по способности образовать те или иные клетки зародышевых листков [Minger, цит. по 46]. Даже внутри одной колонии ЭСК человека обнаруживались региональные различия в экспрессии определенных маркеров [Laurson, цит. по 46]. В недифференцированных гонадах женского пола были выявлены ЭСК, активность которых обеспечивала созревание ооцитов, их партеногенез и получение нового поколения СК, способных вновь дифференцироваться в ооциты [Byskov, цит. по 46]. Авторы заключили, что появление различий между линиями ЭСК человека и внутри этих линий обусловлено факторами транскрипции, которые могут влиять на клетки-предшественники во ВМБ, а также на генетический фон и условия культивирования. В последние годы были разработаны стандартные условия культивирования ЭСК человека, исключающие возможность загрязнения их белками животного происхождения. По данным Hwang и др. [334], 11 таких линий ЭСК человека применяются в настоящее время для исследовательских целей без упоминания всех данных по их культивированию и потенциалу дифференцировки.

1.4. Экспансия ЭСК

Одно время считали, что применение подложки из митотически инактивированных мышинных фибробластов (так называемых «фидерных клеток») является обязательным условием для образования колоний ЭСК в культуре [599]. Потом установили, что ЭСК мышей могут пролиферировать в отсутствие фидерных клеток, если к среде, содержащей ФТС, добавляют LIF*. Этот цитокин поддерживает мышинные ЭСК через активацию комплекса белков STAT3. Однако в бессывороточной среде одного LIF оказывается недостаточно, чтобы предупредить дифференцировку ЭСК мыши в нейральные клетки [601]. Ying и др. [825] сообщили, что пролиферацию мышинных ЭСК в такой среде можно поддерживать добавлением к LIF костных морфогенетических белков (BMP). Предполагают, что действие BMP на мышинные ЭСК осуществляется через индукцию белков ингибиторов дифференцировки и подавление экстраклеточных рецепторов киназы (ERK) и белковых киназ, активируемых митогеном p38 (MAPK). В недифференцированных ЭСК человека путь LIF/STAT3 не действует, и одного LIF при на-

* LIF — лейкемию ингибирующий фактор (Leukaemia Inhibition Factor) — фактор сохранения ЭСК мыши в недифференцированном состоянии, секретируется клетками яйцевода и повышается на стадии бластоцисты. У грызунов он способствует сохранению жизнеспособности ВМБ во время эмбриональной диапаузы (выдерживание эмбриона в репродуктивном тракте до прекращения грудного вскармливания предыдущего помета). Во время этой стадии при наличии LIF образуется слой внеэмбриональной энтодермы [Shen & Leder: 1992].

личии ФТС недостаточно для поддержания роста этих клеток [332]. Авторы некоторых работ [540, 584], проведя анализ многочисленных данных, вообще пришли к заключению, что ЭСК человека на LIF не реагируют.

Проблема поддержания экспансии ЭСК человека в отсутствие фидерных клеток была темой многочисленных исследований. Пока еще не известны все основные факторы, производимые фидерными клетками. Предполагают, что в их число входят различные секретируемые вещества; компоненты, связывающиеся с клеточными мембранами; белки экстраклеточного матрикса. Не ясна также роль взаимодействия специфических рецепторов клеток с лигандами, сигнальными факторами и другими молекулами клеток. Сообщалось, что ЭСК могут быть сохранены на бесклеточной основе, если им обеспечивается кондиционная среда мышиных фибробластов [59, 328, 629]. Матриксами в этой работе были матригель или ламинин, содержащие экстракт из базальных мембран саркомы мышей. Но вскоре стало ясно, что применение клеток грызунов или экстрактов опухолей животных для выращивания СК человека с перспективой их дальнейшего клинического использования вряд ли благоразумно. Вследствие этого стали заменять экстракты мышиных фибробластов клетками плодов человека или использовать в качестве фидерных клеток доступные клетки постнатального человека. Richards и др. [636] сообщили, что длительный рост ЭСК человека могут поддержать клетки кожи и мышц 14-недельных плодов. Novatta и др. [328] кроме клеток мышц и кожи плодов человека использовали в качестве фидера эпителиальные клетки маточных труб, удаленных у женщин во время операций, или постнатальные фибробласты крайней плоти. После длительного культивирования на этих клетках ЭСК продолжали экспрессировать маркеры недифференцированных клеток: ЩФ, Oct3/4, SSEA-4 и др. Genbacev и др. [269], выделив и применив для культивирования ЭСК фибробласты из хориона человека (срок гестации 6–9 недель), пришли к заключению, что эти клетки в качестве фидера сравнимы или даже лучше фибробластов из эмбрионов мышей. По данным Cheng и др. [145], ЭСК линии H1, культивированные на облученных клетках стромы КМ человека, увеличивали свою численность более чем в 100 раз за время непрерывного 30-дневного культивирования (5 пассажей). Полученные таким методом ЭСК человека имели нормальную морфологию и содержали маркеры, характерные для недифференцированных клеток человека, культивированных на мышиных фибробластах. Они экспрессировали фактор транскрипции Oct3/4, ЩФ и стадиеспецифический эмбриональный антиген SSEA-4, но не SSEA-1; сохраняли множественный потенциал к дифференцировке *in vitro* (в эритроидную, миелоидную, мегакариоцитарную, остеогенную и В-лимфоидную линии) и нормальный диплоидный кариотип. Легко получаемые клетки стромы КМ человека и система, позволяющая обходиться без клеток животных, могут обеспечить клинически безопасный и этически приемлемый метод получения ЭСК человека для клеточной терапии. Активность системы обусловлена, вероятно, образованием клетками стромы человека цитокинов, включая IL-6, IL-11, также как SCF и Flt3/Flk2-лиганд, хотя пока не могут назвать все молекулы, производимые фидерными клетками и необходимые СК человека в культуре. На необлученных клетках стромы КМ колонии ЭСК имели более однородную морфологию. Однако пролиферация СК в таких культурах была замедленной, поскольку фидерные клетки делились быстрее, чем СК. Поэтому позднее прекратили использовать в культурах пролиферирующие клетки стромы человека, и теперь в качестве фидерных клеток применяют только облученные клетки.

Кроме фидерных клеток, важным условием успешного выращивания ЭСК является наличие в культуральной среде ФТС. В тех случаях, когда культивирование проводят в бессывороточной среде, в нее вносят коммерческий заменитель сыворотки и bFGF [58, 742], с которыми эффективность клонирования значительно повышается. При наличии в среде ФТС bFGF не проявляет выраженного эффекта, но в бессывороточной среде этот фактор существенен для подавления дифференцировки и сохранения популяции ЭСК. Amit и др. [58] сообщили, что bFGF, TGF β и LIF обеспечивают длительный рост ЭСК человека с сохранением плюрипотентности даже в отсутствие фидерных клеток.

Одним из эффектов bFGF может быть подавление сигнала костного морфогенетического белка (BMP), индуцирующего дифференцировку. ФТС и широко применяемый заменитель сыворотки имеют значительную активность, подобную BMP, которая может снижаться при кондиционировании среды на фибробластах. При добавлении в питательную среду, содержащую умеренные концентрации bFGF (40 нг/мл), ноггина или других ингибиторов сигнала BMP, наблюдали значительное снижение дифференцировки ЭСК человека. Предполагают, что bFGF повышает экспрессию лигандов TGF β как в фидерных, так и в культивируемых клетках, которая, в свою очередь, может способствовать самообновлению ЭСК человека [277]. Положительное влияние на рост ЭСК человека имеют также такие факторы роста, как Wnt, IGF1 [83], херегулин (heregulin), клейотропин, сфингозил-1-фосфат и PDGF, но есть также другие важные регуляторы, которые еще должны быть идентифицированы [833].

После снятия с фидерного слоя и перевода из условий, блокирующих дифференцировку, в жидкую среду, ЭСК быстро пролиферируют, начинают агрегировать и превращаются в структуры, называемые эмбрионидными тельцами (ЭТ). Эти структуры напоминают ранние постимплантационные эмбрионы. Иногда развитие ЭТ проходит несколько стадий, начинаясь с простейших, когда они похожи на морулу, и заканчиваясь через 7–14 дней образованием полостных и кистозных ЭТ. В каждой культуре степень дифференцировки ЭТ может варьировать. ЭТ ЭСК линии Н9, растущие 8–14 дней в суспензионной культуре, а затем перенесенные для дальнейшей дифференцировки на обработанный желатином пластик, давали рост в виде сливных пластов, содержащих различные типы клеток, являющиеся производными всех трех зародышевых листков [203]. Среди них были нейральные клетки с обильным ростом аксонов и дендритов, пигментированные и непигментированные эпителиальные клетки, ритмично сокращающиеся кардиомиоциты [314, 479, 548, 802] и др. ЭТ клеток линии Н9 человека экспрессировали гены α -фетопротеина, субъединицы 68 кD нейроволокон, S-глобина, α -актина сердца, нейроэктодермы и производных мезодермы [742].

После посева ЭСК человека, дифференцированных на клетках стромы КМ мышей, но без добавления экзогенных факторов роста, наблюдали дифференцировку СК в кистозные структуры, напоминающие желточный мешок, или превращение их в клетки, дающие характерный рост в виде «пласта булыжников», типичный для роста кроветворных предшественников. Но выявить методом проточной цитофлуорометрии антиген CD34 на клетках из «пласта булыжников» не удавалось. Только при культивировании ЭСК, дифференцированных на клетках стромы КМ мышей, в метилцеллюлозной среде получили большое количество кроветворных колоний эритроидного, макрофагального, гранулоцитарного и мегакариоцитарного типов [548].

Плюрипотентные клетки человека высокочувствительны к диссоциации и при низкой плотности размножаются плохо с эффективностью роста приблизительно 0,25 % [548]. Однако нередко даже при оптимальных условиях культивирования выявляют спонтанную дифференцировку ЭСК. Появление уже небольшого числа дифференцированных клеток часто приводит к уменьшению содержания плюрипотентных ЭСК в культуре, включению программы апоптоза и быстрой дифференцировки оставшихся клеток. В таких случаях культуру ЭСК можно поддержать, элиминируя дифференцированное потомство [698]. Для успешного культивирования ЭСК человека рекомендуют проводить рассечение колоний под микроскопическим контролем, снижая их размеры настолько, чтобы предотвратить интенсивную дифференцировку, но оставляя фрагменты достаточно большими, чтобы обеспечить жизнеспособность клеток. Культуральные условия, применяемые в настоящее время для экспансии клонов ЭСК человека, являются, вероятно, субоптимальными. В этих условиях ЭСК человека, в отличие от ЭСК мыши, при высокой плотности клеток, получаемой при диссоциации колонии на отдельные клетки, погибают [59]. Только 0,1–1 % клеток, посеянных на пластик, образует колонии, способные к дальнейшему размножению. Большая часть получаемых клонов также теряется вследствие необратимой дифференцировки. Кондиционная среда ЭСК человека, культивируемых с ФТС, способствует выживанию клеток с сохранением их недифференцированного статуса. Полагают, что критическими факто-

рами, которые обеспечивают недифференцированный рост ЭСК в культуре, являются качество и плотность фидера, осмотическое давление, pH, температура среды, а также наличие некоторых добавок, таких как б-меркаптоэтанол и bFGF [59, 743]. Высокая концентрация ФТС в культуре агрегатов ЭСК является наиболее мощным индуктором генов мезодермальных клеток. Ключевым регулятором образования мезодермы является фактор транскрипции Srf (serum response factor) [26]. В среде без сыворотки максимальную дифференцировку мезодермы (25–40 % клеток) обеспечивают BMP-4, TGFβ и Nodal. Ретиноевая кислота, индуцируя нейрогенез, полностью блокирует образование мезодермальных клеток в культуре ЭСК. Напротив, BMP-2 блокировал развитие нейроэктодермы и селективно индуцировал образование внеэмбриональной энтодермы [75]. В мутантных ЭСК с выключенными генами Nodal и TGFβ (Nodal^{-/-} TGFβ^{-/-}) наблюдали усиленный нейрогенез за счет полного дефицита мезодермы и эктодермы [753]. Основная часть мезодермы в культуре агрегатов ЭСК образуется из разрозненных ЭСК со статусом эпителиальных клеток (Е-кадхерин-позитивные клетки) [26].

ЭСК человека, в отличие от ЭСК мышей и других животных, отличаются некоторыми характерными особенностями роста [обзор 362]. Для их размножения необходимо сохранение контактов клетки с клеткой. Спонтанная дифференцировка колоний ЭСК человека начинается с центрально расположенных клеток, тогда как в колониях ЭСК мыши дифференцировка иницируется с периферии колоний [551]. ЭСК человека растут медленнее со средним временем удвоения числа клеток 30–40 часов [574]. Основные ростовые факторы, способствующие сохранению плюрипотентности ЭСК человека, — FGF2, образуемый клетками фидерного слоя, и IGF (инсулиноподобный фактор роста), секретируемый ЭСК человека [83]. В отсутствие фидерного слоя и других наружных факторов сохранность ЭСК человека могут обеспечить активин A/Nodal и FGF2. Предполагают, что роль активина A при этом заключается в подавлении сигнального пути медиаторов BMP4 Smads 1 и 5, поддерживающих пролиферацию без дифференцировки. Но плохо еще представляют, каким образом сигнальные пути, контролируемые наружными факторами, сохраняют внутреннюю сеть транскрипционных факторов, необходимую для плюрипотентности [362].

1.5. Плюрипотентность ЭСК

ЭСК обладают уникальным сочетанием функций, предоставляющим им возможность неограниченно пролиферировать в культуре и дифференцироваться, как предполагают, в клетки любой из 250 специализированных линий организма [25]. Плюрипотенция, то есть способность ЭСК образовывать все клетки эмбриона и взрослой особи, первоначально отмечается в процессе эмбриогенеза у клеток ВМБ и последующего эпибласта. Подобная способность обеспечивается наружными факторами, вносимыми в среду роста извне или образующимися фидерными клетками [698, 799]. Благодаря этому создается необходимая для функционирования клеток наружная сигнальная среда. Эти же факторы ответственны за поддержание сети ключевых внутриклеточных факторов транскрипции, контролирующей плюрипотентность. В эту сеть включают гомеодомен фактора транскрипции Oct4 [537, 540], гомеодомен фактора транскрипции Nanog [143, 329, 511] и фактор транскрипции Sox2 [Avilion et al., 2003].

На более поздних стадиях развития особи плюрипотентность может устанавливаться в дифференцированных или неплюрипотентных клетках при экспозиции ядра с наружными факторами. В частности, введение ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит, называемое переносом ядра соматической клетки (SCNT), приводит к появлению клеток, способных вызвать образование зрелого организма. Таким образом была создана овца Долли [800, 801] и получены многие клоны разных видов млекопитающих [285]. Потеря плюрипотентности и способности к образованию специфических линий клеток вызывает изменения экспрессии генов, которые заключаются в снижении содержания ключевых факторов транскрипции, поддерживающих плюрипотентность, или повышении уровней регуляторов дифференцировки [362, 613], и сопровождаются рядом эпигенетических изменений, включающих метилирование ДНК [451, 822],

ацетилирование гистонов [142] и ремоделирование хроматина [69, 506] (подробнее см. главу 8). Недавнее обнаружение специфических комбинаций эпигенетических маркеров, связанных с плюрипотентностью [69], подтверждает значение эпигенетической регуляции в контроле судьбы клетки.

Плюрипотентность — врожденное нестабильное состояние клетки; и ЭСК «настроены» («примированы» [362]) к быстрой дифференцировке. Для сохранения плюрипотентности в культуре необходимо обеспечить наличие в среде определенных ростовых факторов. Для ЭСК мыши таким фактором, как мы уже отмечали, является LIF, способный поддержать рост ЭСК мыши в отсутствие фидерного слоя фибробластов [613]. Синергично с LIF по отношению к ЭСК мыши действуют сигнальные белки семейства Wnt и аутокринные петли сигнала activin/Nodal [обзор 362, 663]. В ЭСК мыши LIF активирует JAK/STAT сигнальные и митогеном активированные пути белковой киназы (MapK). Выбор между плюрипотентностью и дифференцировкой зависит от баланса между STAT3 и экстраклеточным сигналом, регулирующим киназную (ERK и MapK) активность, соответственно. В ЭСК мыши BMP4 предупреждает дифференцировку через подавление экстраклеточных рецепторов киназы (ERK) [602] и индукцию других ингибиторов дифференцировки, таких как Ids [825]. Stat3 активирует много генов, играющих важную роль в плюрипотентности, включая c-myc [138], Nanog [143, 144, 478, 511], eed [759], jmj1a [391] и GABP α , которые, по всей вероятности, необходимы для сохранения экспрессии Oct-3/4 [386].

Ни STAT3, ни активность BMP4 не участвуют в поддержании плюрипотентности ЭСК человека [332, 812], тогда как активность ERK необходима для сохранения плюрипотентности этих клеток [64, 450]. Известно также, что продолжительная активация c-myc в ЭСК человека индуцирует дифференцировку и апоптоз [713]. Таким образом, внутриклеточные сигналы, регулирующие плюрипотентность в ЭСК мыши и человека, имеют, кажется, небольшое сходство, несмотря на сохранение внутренней сети транскрипционных факторов и одинаковые функции этих клеток [362].

Наиболее убедительным доказательством плюрипотентности является способность ЭСК пролиферировать и дифференцироваться во многие клеточные линии при введении их в бластоцисты [548, 629]. Но по понятным этическим причинам способность ЭСК человека колонизировать все ткани новорожденного ребенка после введения в организм эмбриона проверить нельзя. Потенциал развития ЭСК человека можно, однако, установить, инокулируя эти клетки в организм иммунодефицитного животного [583, 742].

Одним из основных принципов исследований ЭСК человека является установление путей их нормального развития. По ним можно точно определить, когда начинается образование данной специфической ткани у эмбриона. После этого можно попытаться воссоздать эти процессы *in vitro*. Методы, используемые *in vitro* для получения специфических типов клеток, должны обеспечивать культуральные условия, благоприятствующие дифференцировке в желаемый тип клеток.

Перспектива получения чистых популяций дифференцированных клеток стимулирует разработку методов дифференцировки ЭСК *in vitro* в лабораториях многих стран мира. На практике, однако, если принимать за основу более значительный опыт работы с ЭСК мышей, такая возможность до сих пор в полной мере не реализована. Ряд подходов был разработан, чтобы приблизиться к этой цели. Наиболее простой метод заключается в использовании спонтанной дифференцировки для получения интересующего типа клеток [446]. Процесс спонтанной дифференцировки может быть усилен при проведении его в условиях, являющихся субоптимальными для культивирования СК, но обеспечивающих выживание дифференцированных клеток. У мышей индукция дифференцировки связана с образованием ЭТ. Многие исследователи культивировали ЭСК мыши в суспензиях, способствующих образованию клеточных агрегатов. В этих условиях ЭСК образовывали двухслойные ЭТ с наружным слоем, обладающим свойствами внеэмбриональной энтодермы, и внутренним слоем, содержащим плюрипотентные клетки. Предполагают, хотя это еще не доказано, что наружная энтодерма посылает сигналы, вызывающие дифференцировку плюрипотентных клеток. В ряде случаев при этом получают большое

разнообразие клеток. К настоящему времени достигнут успех в индукции дифференцировки ЭСК мышей в такие типы клеток как кардиомиоциты [107, 388, 802], гладкомышечные клетки [213, 536], нейральные клетки [71, 129, 438, 492,], кроветворные клетки [457, 597], гепатоциты [149, 151, 289, 342, 407, 506, 815] и инсулинпродуцирующие клетки [467, 702, 703]. Из ЭСК человека были получены нейрогенные клетки [629, 667], кардиомиоциты [308, 379], эндотелиальные клетки [445], остеобласты [706], кроветворные клетки [343, 374], гепатоциты [614] и инсулинпродуцирующие клетки [67].

Образование некоторых типов клеток из ЭСК можно оптимизировать применением ряда разработанных подходов. Наиболее простым из них является добавление определенных ростовых факторов или химических веществ в культуральную среду клеток. Например, у мышей чистые популяции предшественников тучных клеток могут быть получены из ЭСК, культивированных в среде с наличием IL-3 и SCF [265]. Более сложные методы включают отбор тканеспецифических прогениторных клеток, активированных флуоресцентными красителями (FACS) с помощью лазерного сортировщика клеток. При отсутствии антител, которые бы позволили отсортировать клетки, можно иногда использовать лекарственную селекцию или экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP), ген которого вводится в ЭСК под контроль промоторов, являющихся специфичными для определенного типа клеток. Применение такого подхода позволило получить из ЭСК мышей кардиомиоциты и клетки, секретирующие инсулин [388, 525, 702]. В других случаях использовали экспрессию у ЭСК факторов транскрипции, которые способствуют дифференцировке в специфическую линию, таких как, например, GATA 4 и GATA 6 для клеток примитивной энтодермы [253], NohB4 для предшественников кроветворных клеток [309] и Nurr1 для дофаминергических нейронов. Специфическую дифференцировку ЭСК в желаемом направлении можно также вызвать при совместном культивировании их с некоторыми другими клетками. Например, дифференцировка в кроветворные клетки или дофаминергические нейроны индуцируется при культивировании ЭСК мыши на фидерном слое клеток стромальных линий OP9 или PA6, соответственно [376, Nakano et al., 1996]. Интересно отметить, что интенсивные исследования плюрипотентности проводили на ЭСК многих видов животных, но только из мышей были получены ЭСК, удовлетворяющие всем критериям плюрипотентных клеток [334].

Методы, разработанные на ЭСК мышей, применяются для получения дифференцированных клеток из ЭСК человека. Некоторые исследователи вначале из этих клеток получают ЭТ, а затем индуцируют их дифференцировку. В других лабораториях используют выращивание ЭСК человека в монослойной культуре при высокой плотности клеток. В подобных условиях можно добиться спонтанной клеточной дифференцировки, сопровождающейся образованием кист и возникновением большого разнообразия дифференцированных клеток. Хотя некоторые исследователи считают, что вряд ли какой-либо один фактор может строго регулируемым образом изменить направление дифференцировки ЭСК [343], есть положительные примеры такого воздействия, создающего исключительные благоприятные условия для какой-то одной специфической линии [540, 584]. Установлено, например, что ретиноевая кислота индуцирует нейрогенез; BMP-2 — образование эпителия энтодермы; BMP-4 в комбинации с сывороткой наиболее активно стимулировал образование энтодермы; TGF- β — индукцию преимущественно мышечных линий; IL-6 и IL-3 — стимулировали образование, соответственно, эритроидных и моноцитарно-миелоидных линий [668]. Предполагают, что действие внешних факторов реализуется через экспрессию транскриптаз, представленных в клетках в ограниченных количествах. Например, экспрессия FoxA2 в примитивной энтодерме автоматически запускает реэпителизацию мезенхимы в эпителий [26].

Описано много разных методов по созданию селективных условий культуры, способствующих росту одного клеточного типа при подавлении другого [148, 445]. В частности, предпринимались попытки селекции необходимых клеток на основе экспрессии специфических поверхностных маркеров. Известны также попытки генетической модификации ЭСК путем введения

в них пригодного для селекции маркера под контроль специфического для этой линии промотора, например, какого-нибудь фактора транскрипции [698].

В отличие от ЭСК мышей, основное значение для самообновления ЭСК человека имеют FGF и сигнальная система NGFB/ активин/ Nodal [обзор 833]. Из работ последнего времени, в которых сообщается о дифференцировке ЭСК человека *in vitro*, можно выделить исследование Reubinoff и др. [628]. Эти авторы показали, что в условиях, которые подавляют внеэмбриональную дифференцировку и ограничивают рост СК, из ЭСК образуются клетки, экспрессирующие маркеры разных дифференцированных клеточных линий. Наиболее часто в этих условиях отмечалась нейральная дифференцировка и было возможно идентифицировать клетки-предшественники, которые вызвали образование нейральных клеток. После отбора этих предшественников, осторожной дезинтеграции их и переноса в культуральную среду, поддерживающую нейрогенез, получали нейросферы — округлые плавающие агрегаты, содержащие нейрогенные прогениторные клетки, которые могли быть серийно размножены или индуцированы к дифференцировке в клетки со свойствами зрелых нейронов. В последующей работе названных авторов [629] было показано, что эти предшественники при трансплантации в мозг новорожденных мышей разрастаются там и подвергаются региональной дифференцировке во все типы клеток нервной ткани. Однако существует опасение, что нейрогенные прогениторные клетки, полученные таким образом, будут отличаться по своим свойствам от нейрогенных СК, выделенных из фетальной или взрослой ЦНС. Так, имеются данные, свидетельствующие о том, что нейрогенные клетки-предшественники, полученные из ЭСК, обладают более высокой пластичностью, чем пластичность НСК из мозга плода или взрослого человека [11].

Изучение *in vitro* спонтанно дифференцирующихся культур ЭСК человека выявило возможность получения еще нескольких типов клеток, имеющих клиническое значение. В ряде лабораторий было показано [67, 343], что ЭСК человека могут образовать инсулинпродуцирующие клетки и кардиомиоциты. Инсулинпродуцирующие клетки образовывались в монослое (при отсутствии фидерного слоя) или выявлялись в ЭТ. Продукция инсулина у небольшого числа клеток была подтверждена ПЦР с обратной транскриптазой, иммуноокрашиванием и определением гормона в культуральной среде, хотя выявить реакцию секреции инсулина на изменение уровня сахара не удалось. С помощью ПЦР обнаружили также экспрессию некоторых других маркеров ранней панкреатической дифференцировки. При изучении образования кардиомиоцитов было установлено, что небольшая часть ЭТ, происходящих из клеток линии Н9, вызывала появление пластов сокращающихся клеток. Данные изучения экспрессии маркеров, ультраструктуры клеток, электрофизиологических и фармакологических реакций поддержали заключение, что сокращающиеся клетки являются ранними кардиомиоцитами.

Другими исследователями из культуры ЭСК человека были получены эндотелиальные клетки [375, 445]. После спонтанной дифференцировки из ЭТ были выделены и подвергнуты экспансии клетки, обладающие поверхностным маркером PECAM1. В ЭТ, образующихся из этих клеток, до 2 % клеток были позитивными на маркер PECAM1 и другие маркеры эндотелиальных клеток. После трансплантации PECAM1-позитивных клеток иммунодефицитным мышам наблюдали образование микрососудов из этих клеток.

Kaufman и др. [374] показали, что культивирование ЭСК человека на клетках стромы КМ или желточного мешка мышей может индуцировать дифференцировку небольшой части клеток в кроветворные прогениторные клетки. Кроветворные предшественники были CD 34-позитивными и экспрессировали факторы транскрипции, характерные для ранних предшественников клеток крови. Исследования колониеобразующей способности *in vitro* показали, что происходящие из ЭСК клетки могут дифференцироваться в эритроидную, миелоидную и мегакариоцитарную линии. Авторы высказали предположение, что стромальные фидерные клетки способны либо прямо индуцировать дифференцировку ЭСК, либо обеспечивают выживание кроветворных клеток-предшественников, спонтанно возникающих из мезодермальных прогениторных клеток.

Большой успех в изучении молекулярно-генетической основы плюрипотентного состояния стал возможен с выявлением сети ауто- и перекрестно действующих контрольных механизмов, опосредованных тремя ключевыми факторами транскрипции — Oct-3/4, Nanog и Sox2 [115, 464]. Каждый из этих факторов необходим для плюрипотентности как *in vivo*, так и *in vitro*. Потеря Oct-4 или Nanog приводит к утрате плюрипотентности и спонтанной дифференцировки клеток в трофоэктодерму и примитивную энтодерму, соответственно [143, 144, 511, 537, 540]. При повышенной экспрессии Nanog, но не Oct4, плюрипотентность в ЭСК мыши сохраняется даже в отсутствие LIF, а в ЭСК человека и приматов — в отсутствие фидерного слоя, но клетки приобретают сходство с примитивной эктодермой [143, 478, 511, 821].

Хотя известны культуральные условия и наружные факторы, способствующие сохранению плюрипотентных свойств клеток, плохо еще представляют, как сигнальные пути, контролируемые этими факторами, обеспечивают сохранение внутренней сети транскрипционных факторов, необходимой для проявления плюрипотентности. В последние годы ряд исследователей, применяя метод иммунопреципитации хроматина (ChIP) и антитела к ключевым регуляторам транскрипции, попытались определить гены, мишени этих антител, в ЭСК мыши и человека. Было установлено, что в ЭСК как одного, так и другого происхождения многие гены-мишени связываются комбинациями Oct4, Nanog и Sox2 [114, 464], причем в мишени включались как задействованные в транскрипции гены, так и неактивные гены. При проведении расширенного анализа сети транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Nanog, c-Myc и Klf4 в ЭСК мыши с включением белков, взаимодействующих с Oct4 или Nanog (Rex1, Dax1, Zfp 281 и Nac1), установили, что многие промоторы были связаны с разнообразными общими факторами. Промоторы, связанные с малым числом факторов, были обычно неактивны, тогда как промоторы, связанные с 4-мя или большим числом факторов, были активны в ЭСК и репрессировались при дифференцировке [382, 778]. Adjaye et al., применяющие ту же методику, пришли к заключению о наличии в СК всех млекопитающих (от человека до опоссума) сложных эволюционно законсервированных генетических модулей, содержащих транскрипционные сети, регулируемые *Oct4* [46].

У ЭСК человека, получаемых общепринятым методом из ВМБ, выявлена наиболее частая возможность дифференцировки *in vitro* по более десяти различным направлениям [11, 228], однако пока не ясно, с чем связано это ограничение. В общем, приходится согласиться, что, несмотря на большие достижения, основные вопросы стойкой направленной дифференцировки ЭСК человека в специфические линии пока не решены [11]. Неизвестно, каким образом транскрипционные факторы обеспечивают плюрипотентность, как ростовые факторы контролируют и стабилизируют сложные сети этих факторов и каким образом СК реагируют так точно на сигналы дифференцировки. Внимание исследователей по-прежнему привлекают примечательные свойства ЭСК — способность к продолжительному самообновлению, сохранению минимального фенотипа и минимума программ для взаимодействия с микроокружением без проявления какой-либо реализуемой специализации, а также теоретически неограниченный потенциал пролиферации и дифференцировки, обусловленный особенностями фенотипа незрелых клеток.

1.6. Перспективы использования ЭСК в биологии и медицине

1.6.1. ЭСК как клетки выбора в лечении заболеваний человека

В связи с тем, что фенотипические характеристики пролиферирующих ЭСК человека остаются неизменными после более чем 20–30 пассажей, и эти клетки отличаются от большинства соматических клеток отсутствием или очень низкой представленностью антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС) I и II классов [11, 38, 215, 216], перспектива использования ЭСК и ЭЗК человека в качестве источника клеток для клеточной терапии привлекает исследователей в области экспериментальной и клинической медицины. Альтернативу ЭСК в плане клеточной терапии могут составить собственные клетки больного, содержащие региональные СК. Предполагается, что эти клетки могут быть размножены в культуре и затем введены

больному без риска иммунного отторжения. Однако региональные СК уже специализированы в некоторой степени, в связи с чем их потенциал в регенерации поврежденной ткани может быть более ограничен по сравнению с ЭСК, которые теоретически могут дифференцироваться в любой клеточный тип. Таким образом, ЭСК могут быть клетками выбора в лечении ряда заболеваний [30]. Один из решающих этапов такого лечения — получение желаемого типа клеток путем дифференцировки ЭСК. Но, хотя описаны многочисленные ключевые факторы и этапы направленной дифференцировки, природа сложной культуральной системы не позволяет пока устанавливать точное направление специфической клеточной дифференцировки. Поэтому решающим фактором для широкого применения ЭСК человека в клинической практике является оптимизация современных протоколов и/или развитие новейших методов точно контролируемой дифференцировки. Самые примечательные свойства ЭСК — способность к продолжительному самообновлению и теоретически неограниченный потенциал пролиферации и дифференцировки, связанный с особенностями фенотипа незрелых клеток — по-прежнему привлекают к ним внимание исследователей.

1.6.2. Дифференцировка ЭСК в кардиомиоциты

Методы дифференцировки кардиомиоцитов из мышинных ЭСК хорошо изучены и дают возможность получить клетки предсердий, желудочков и синусных узлов [308, 479, 802]. Оригинальная методика получения из ЭСК мыши суспензии кардиомиоцитов была представлена Klug и др. [388]. Авторы применили метод трансдукции гена резистентности к гентамицину (G418), запускаемого специфическим промотором кардиомиоцитов. После трансплантации в сердце мыши с кардиодистрофией эти кардиомиоциты приживлялись, разрастались и функционировали *in situ*. Другие исследователи представили подобные же результаты на основании изучения колонизации модифицированными клетками сердца мышей с экспериментально вызванным инфарктом [509, 817, 824]. Аденовирусные векторы применялись, чтобы ввести в мышинные ЭСК гены-репортеры, экспрессия которых запускалась геном легких цепей специфического миозина предсердий. Посредством этого достигалась возможность получения чистой популяции кардиомиоцитов предсердий [822]. Дифференцировка кардиомиоцитов из ЭСК мышей повышалась 5-аза-2'-дезоксцитидином, но не ретиноевой кислотой [811]. Однако, кардиомиоциты, полученные этим методом из ЭСК человека, оставались незрелыми, хотя обладали структурными и функциональными свойствами клеток сердца плода [379]. На основании этих опытов пришли к заключению, что ЭСК повторяют развитие эмбриональных, но не взрослых клеток [239].

Долгое время дифференцировку ЭСК человека в кардиомиоциты проводили по протоколам, разработанным для ЭСК мышей, в которых применялись смешанные популяции клеток [308, 343, 379, 527, 811]. Дальнейшие исследования позволили установить, что более высокая эффективность достигается при трансплантации специфического типа кардиомиоцитов. В частности, было показано, что для колонизации сердца больного с инфарктом миокарда или хронической сердечной недостаточностью целесообразнее вводить кардиомиоциты желудочков, но не клетки синусно-предсердного узла, потому что последние в экспериментах на животных чаще вызывали аритмию и даже гибель реципиентов [238]. Таким образом, чтобы ЭСК человека стали клиническим источником разрастающихся клеток сердца, необходимо разработать технологию получения чистых популяций определенных типов клеток.

1.6.3. Дифференцировка ЭСК в кроветворные клетки

Первые сообщения об образовании клеток крови из ЭСК мыши появились почти 20 лет назад, после того как было впервые описано получение ЭТ из ЭСК. Однако, для достижения на полученных мышах стабильного приживания КСК, происходящих из ЭСК, вновь потребовались многочисленные эксперименты и значительное время [324, 524, 826]. В большинстве работ кроветворные клетки, происходящие из ЭСК, представляют собой примитивные эмбриональные клетки-предшественники, не способные к долговременному приживлению. Однако недавно,

применив для стимуляции приживания КСК трансдукцию гена гомеобокса *HoxB4*, у летально облученных мышей установили нормальное мультилинейное долговременное кроветворение, полностью происходящее из ЭСК [418]. Аналогичная роль в получении КСК и в обеспечении высокой степени химеризма крови была выявлена у гена *cdx4* [179]. Авторы заключили, что дифференцировка, направляемая генным комплексом *Cdx4-HoxB4*, может индуцировать примитивные эмбриональные клетки-предшественники к приобретению свойств, характерных для взрослых КСК. Предполагают, что гены *Cdx4-HoxB4* обеспечивают то направление развития СК, которое осуществляется во время дифференцировки ЭСК in vivo [444]. Для определения специфических условий дифференцировки ЭСК в КСК, способные с высокой эффективностью и воспроизводимостью обеспечивать нормальное кроветворение, необходимы дальнейшие исследования.

Большое значение для получения сигналов, необходимых для самообновления, выживания и дифференцировки СК, имеет микроокружение последних или ниша. Например, в тех случаях, когда недостаточность КМ обусловлена патологией КСК, как в случае лейкемии или анемии Фанкони, трансплантация КСК будет оказывать терапевтическое действие. Но при миелофиброзе трансплантация КСК такого эффекта не обеспечит, так как болезнь вызывает разрушение ниши КСК, что приведет к гибели трансплантированных клеток. Среди других патологических процессов, при которых могут разрушиться ниши СК, следует отметить ожоги, цирроз печени, некоторые типы нейродегенеративных болезней. При этих условиях может быть некоторая польза от заместительного лечения СК, но последнее должно сопровождаться лечением, направленным на патофизиологический процесс в нишах, которые должны быть восстановлены или замещены [444].

1.6.4. Дифференцировка ЭСК в клетки ЦНС

Образование нервной системы является одним из самых ранних событий в развитии человека. Поэтому не удивительно, что нейрональная ткань обнаруживается в ЭТ, полученных из ЭСК человека [343, 629]. ЭСК мыши, которые дифференцируются в монослойной культуре, также образуют клетки нейрональной ткани [569, 628, 825]. Эта ткань представляет собой обширную коллекцию высоко специализированных клеточных типов, каждый из которых выполняет свою уникальную роль. Для изучения свойств нейрональной ткани, образующейся из ЭСК человека, необходимо освоение направленной дифференцировки клеток и выделение из них специфических нейрональных субтипов. Применяя морфогены и факторы транскрипции, способствующие нейрональному развитию, несколько групп исследователей добились успехов в направленной дифференцировке ЭСК мыши. Для развития ЭСК мыши в эктодермальном направлении Wichterle и др. [795] использовали ретиноевую кислоту. При последующей экспозиции с генами сигнальной системы Hedgehog авторы обнаружили появление спинномозговых двигательных нейронов, которые успешно приживлялись в спинном мозге эмбрионов цыплят с образованием аксонов и формированием синапсов. Нейрональные производные ЭСК мыши были способны образовывать двигательные нейроны у крыс с модельной гемиплегией или повреждением спинного мозга [148, 491]. По данным МсКау и др. [493], сигнальная система Hedgehog и FGF8 может индуцировать дифференцировку ЭСК мыши в клетки среднего отдела спинного мозга, образующие дофаминергические нейроны. Возникшие нейроны восстанавливали в части случаев двигательную дисфункцию у грызунов с моделью болезни Паркинсона [76, 98, 376]. Ряд исследователей продемонстрировали направленное развитие нейронов из ЭСК человека [11, 211, 628, 667].

Но даже если направленная дифференцировка способна привести к образованию подтипов специфических нейронов, некоторые барьеры для их применения остаются. Для того чтобы клетки правильно функционировали, необходима синаптическая связь с соседними нейронами. Хотя синаптические связи высокопластичны, принципы анатомических взаимосвязей нейронов и главных сигнальных трактов устанавливаются во время развития эмбриона и плода. Регенерирующие нейроны должны правильно интегрироваться с имеющимися развитыми нейронами для

установления функционирующей нейральной сети. Способность клеточных типов, происходящих из ЭСК, к экспрессии эмбриональных фенотипов может предрасполагать их к некоторой внутренней пластичности, которая должна обеспечить функциональную интеграцию.

Считают, что производные ЭСК человека, которые будут применяться в клинике, не должны содержать трансгенов, способных вызвать непредсказуемый риск мутагенеза. Методы, используемые для обеспечения необходимой чистоты клеток, должны основываться на определении их эндогенных характеристик и маркеров клеточной поверхности без применения генов-репортеров. В тех же случаях, когда потребуется введение трансгенов, должны использоваться системы, обеспечивающие безопасность всего процесса [444].

1.6.5. Изучение эмбриогенеза с помощью эмбриональных стволовых клеток

К настоящему времени установлено, что начальными движущими силами гастрюляции и органогенеза во время эмбриогенеза являются эмбриональная индукция и обратимые эпителио-мезенхимальные переходы. В качестве мишени действия этих сил выступают не изолированные стволовые плюрипотентные клетки, а примитивные первичные ткани зародыша [26]. Механизмы эмбриональной индукции можно наблюдать в культуре ЭСК. Так, частота образования кардиомиоцитов из ЭСК, растущих на фидере из фибробластов, составляет 7–16 %, тогда как добавление к культуре эксплантата кардиогенной мезодермы/эндодермы птиц увеличивает образование ритмически сокращающихся кардиомиоцитов до 100 % [651]. Предполагают, что главным индуктором кардиомиоцитов в такой культуре является сигнал-индуктор *Sparc*, выделяемый клетками мезенхимальной кардиогенной эндодермы. В этих клетках *Sparc* индуцирует экспрессию *GATA-4*, *GATA-6*, *Nkx 2.5* и *Mef2C*. Ингибиторы *Sparc*/*BMP-2* подавляют кардиогенез из ЭСК.

Аналогично, степень возникновения эндотелиоцитов при спонтанной дифференцировке ЭТ, происходящих из ЭСК, в среде с высокой концентрацией сыворотки обычно не превышает 1–3 %. При внесении в культуру экстраэмбриональной эндодермы, но не мезодермы или эктодермы, наблюдали образование из клеток эпибласта типичных мезодермальных клеток с фенотипом *Brachyury*⁺ *Goosecoid*⁺ *Flk1*⁺ *PDGFRA*⁺ [26].

В культуре ЭСК можно наблюдать стадийное развитие разных популяций мезодермальных клеток, имеющих свои отличительные признаки и специфические функции. Первое поколение мезодермальных клеток, формирующих экстраэмбриональную мезодерму, дифференцируется в гематоэндотелиальные клетки желточного мешка в результате сигнального взаимодействия с пластом экстраэмбриональной эндодермы [26]. Следующая значимая популяция мезодермальных клеток, характеризующихся фенотипом *PDGFRA*⁺ *Flk1*⁺, образует прогениторные клетки с фенотипом *Tbx6*⁺ *Mesp2*⁺ *Dil1*⁺ *Follistatin*⁺ *FGF8*⁺, которые окончательно дифференцируются в хондроциты, остециты и другие линии соединительной ткани [82]. Эти первые МСК, способные к образованию клонов, впервые идентифицируются в районе развития зачатков аорты, гонад и плодовых почек — мезонефроза (регион AMG). Из общего пула примитивной мезодермы (*Brachyury*⁺ *FLK1*⁺ *PDFRA*⁺ клеток) можно выделить клетки, образующие следующую популяцию предшественников, которые дифференцируются в эндотелий, перициты и кровяные клетки.

Плюрипотентность генома «истинных» ЭСК контролируют гены *Oct3/4*, *Nanog*, *FoxD3*, *Rex1*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*. В ходе гастрюляции и формирования мезо-, эндо- и эктодермы происходит снижение экспрессии этих генов. «Плюрипотентность — это специальный статус почти полностью репрессированного генома клеток» [26]. Белки, контролирующие плюрипотентность, характеризуются наличием более 20 доменов связывания и формируют сеть, которая упаковывает в неактивные комплексы все петли хроматина хромосом СК. Активация первой группы генов мезодермы, эндодермы и нейроэктодермы сопровождается выключением экспрессии всех генов, контролирующих плюрипотентность. По этой причине никому до сих пор не удавалось выделить культуру стволовых плюрипотентных клеток, аналогичных ЭСК, из зародышей млекопитающих

после гастрюлы (например, из зародышевых листков). Исключение составляют лишь эмбриональные зародышевые клетки, развивающиеся по специальной программе. Репрограммировать до статуса «истинных» ЭСК *in vitro* удавалось лишь клетки примитивной нейроэктодермы, но не клетки мезодермы или энтодермы [26].

Еще одно обстоятельство, влияющее на успех репрограммирования клеток зародышевых листков,— это антагонизм программ развития зародышевых листков. Например, главные индукторы гастрюляции и мезодермы Nodal, Cripto, TGF β являются сильнейшими блокаторами образования нейроэктодермы. Комплекс Nodal-Cripto — главный триггер гастрюляции — является мощным блокатором, исключаящим экспрессию генов нейроэктодермы (FGF-5, Pax-6, Rex-1, Sox-1, Zpf42, Nkx 2.2 и Neuro D) [232].

В настоящее время ЭСК человека, так же, как подобные клетки приматов и мышей, стали мощным подспорьем для изучения основных и прикладных аспектов биологии. ЭСК используются в качестве тонкого инструмента при изучении функциональной геномики человека, для создания экспериментальных моделей многих заболеваний и проведения на этих моделях лекарственного скрининга. И можно прогнозировать, что в этом отношении интерес к ЭСК еще долго не будет исчерпан.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Avilion A. A., Nicolis S. K., Pevny L. H. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function // *Genes Dev.*— 2003. — Vol. 17. — P. 126–140.
2. Nakano T., Kodama H., Honjo T. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors // *Science.* — 1996. — Vol. 272. — P. 722–724.
3. Shen M. M. and Leder P. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1992. — Vol. 89. — P. 8240–8244.
4. Tanaka T. S., Kunath T., Kimber W. L. *u òp.* Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals genes associated with pluripotency and lineage specificity // *Genome Res.*— 2002. — Vol. 12. — P. 1921–1928.

ГЛАВА 2. РЕГИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

2.1. Общая характеристика региональных стволовых клеток

Кроме ЭСК, которые возникают на ранних стадиях жизни эмбриона и могут образовать все типы клеток взрослого организма, в тканях плодов находятся СК, которые также обладают способностью к самовозобновлению, но потенциал дифференцировки которых ниже, чем у ЭСК. СК со сходными свойствами обнаруживаются после рождения и в течение всей жизни во многих, если не во всех, тканях и органах. Эти СК, локализованные в различных регионах среди зрелых клеток, мы определяем как региональные СК. Они образуются в процессе эмбриогенеза из зародышевых листков (экто-, эндо- и мезодермы) и мезенхимы.

Основная функция региональных СК в организме заключается в поддержании и восстановлении тканей, в которых они находятся. Количество типов дифференцированных клеток, которые могут быть получены из региональных СК, обычно ограничивается тканью или органом, из которых они выделены, но современные данные показывают, что региональные СК нередко проявляют более высокую мультипотентность, чем у них предполагалась. При изучении дифференцировочного потенциала региональных СК рекомендуют иметь подтверждение, что данная клетка относится к клону, происхождение которого из одиночной клетки не вызывает сомнений. Проявление клона клетками разнообразных тканей устраняет возможность случайного попадания в материал для исследования *ex vivo* коммитированных клеток разных типов.

У взрослого здорового человека региональные СК обнаруживаются в виде микровкраплений во всех органах и тканях, включая мозг, КМ, жировую ткань, печень, кожу, ткани ЖКТ, роговицу и сетчатку глаза и даже пульпу зубов. Во всех тканях происходит постоянная гибель некоторого количества клеток и замещение потерянных клеток молодыми, образующимися из региональных СК, даже при отсутствии повреждающего фактора. В большинстве тканей региональные СК составляют минорную популяцию, обычно не превышающую 1 % общего числа клеток. Между региональной СК и ее конечным потомством различают несколько промежуточных форм со всевозрастающей специфичностью и снижающимся потенциалом деления. Они известны как транзиторные амплифицирующиеся или коммитированные, или прогениторные клетки [599, 74, 598]. Постепенно эти клетки дифференцируются до конечной стадии и затем отмирают. В последнее время получила развитие новая эволюционная теория онтогенетической дифференцировки, предполагающая, что потомство региональной СК дифференцируется в градационной манере, приводящей к образованию дочерних клеток с постепенно снижающимся потенциалом дифференцировки, но которые еще могут сохранять способность к межлинейным превращениям [846]. Действительно, было показано, что адипоциты и хондроциты могут быть индуцированы к образованию кости [Bennett J. H., et al., 1991, 261]. Сообщали также об трансдифференцировке ГСК в гепатоциты [419], а нейрогенных предшественников — в мышцы и клетки крови [99, 259].

В результате асимметричного деления каждая региональная СК образует одну дочернюю СК, идентичную материнской клетке, и одну коммитированную клетку, вступающую в дифференцировку. Благодаря асимметричному делению численность СК внутри популяции поддерживается неизменной. В безстрессовых условиях СК в тканях сохраняют замедленную цикличность и, например, в КМ только около 10 % СК одновременно находятся в клеточном цикле. Предполагают, что замедленная цикличность СК представляет собой механизм их защиты от ошибок, которые могут возникать в процессе синтеза ДНК. Другой механизм защиты отмечается у СК кишечника. В этих клетках в процессе деления не расходятся некоторые нити матричной ДНК, что позволяет избежать накопления ошибок репликации в геноме [599].

Для объяснения линейной детерминации СК предложено несколько гипотез: внешнее воздействие (влияние через строму или ростовые факторы); внутреннее воздействие (влияние через ядерные факторы) или сочетанное воздействие. Наибольшее внимание в последнее время уделяется микроокружению, в котором находится СК, — ее нише. Ниша — это субпопуляция клеток ткани и экстраклеточные субстраты, благоприятствующие *in vivo* существованию СК

в недифференцированном состоянии. Трехпространственное окружение, в котором находится региональная СК, контролирует не только ее самообновление, но и продукцию потомства. Поведение и судьба СК на территории ниши определяется набором генов и предсинтезированных белков, транскрипционных факторов, репрограммирующих структуру хроматина, а также соотношением активирующих/ингибирующих эпигеномных сигналов. Поведение СК *in situ* предопределяется сложным сигнальным взаимодействием всех клеток стволовой ниши [26].

Взаимодействие с другими типами клеток и компонентами экстраклеточного матрикса влияет, очевидно, на выживание и развитие коммитированных клеток. Одним из наиболее изученных рецепторов экстраклеточного матрикса является $\beta 1$ интегрин, высокая экспрессия которого может быть необходима для сохранения эпидермальных СК в их нишах, тогда как в отсутствие интегринов СК оставляет нишу, подвергаясь либо дифференцировке, либо апоптозу [604–607]. Наглядным примером ниши являются ниши крипт тонкого кишечника и прямой кишки. Каждая такая ниша образована основанием крипты и окружающими ее мезенхимальными клетками — перикрипталными миофибробластами. Отмечена связь между миофибробластами и эпителиальными клетками крипт. В среднем 4–5 эпидермальных СК располагаются вблизи основания каждой крипты [97]. В процессе жизни число ниш возрастает в соответствии с увеличением команд как от стрессорных факторов развития, так и окружающей среды. Некоторые ниши, такие как крипты кишечника, разветвляются и объединяются; в то время как другие образуются *de novo*.

В клетках стромы экспрессированы гены факторов роста (например, фактора роста цитокератинов, фактора роста гепатоцитов и т. д.), тогда как на эпителиальных клетках располагаются рецепторы для кодированных ростовых факторов. Предполагают, что способность клеток сохраняться в недифференцированном состоянии, пролиферировать или дифференцироваться зависит от экспрессии в клетках некоторых факторов транскрипции. Они могут возникать при действии внутренних или внешних источников или их комбинации, т. е. под влиянием множественных положительных и отрицательных сигналов, получаемых через посредство цитокинов и рецепторов, стабилизирующих определенный путь развития [599]. Показано, что у мышей, например, при отсутствии аллеля HMG для фактора транскрипции Tcf-4 отмечается неспособность поддерживать пролиферацию компетентной популяции крипт тонкого кишечника [Korinek V., et al., 1998].

Известен ряд разновидностей региональных СК из клеток зародышевых листков с четко выраженным ограничением потенциала дифференцировки, которые называют соответственно той ткани или тем клеткам, которые они обычно пополняют. Так, эпителиальные СК, локализующиеся в пищеварительном тракте и коже, способны к образованию клеток всех слоев эпидермы и эпителиальных крипт кишечника [599]. Лимбальные СК, обнаруженные на связке между роговицей и склерой, являются клетками-предшественниками эпителия роговицы, нейральные стволовые клетки (НСК) образуют нейроны и клетки глии, гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) — все клетки крови, а мезенхимальные стволовые клетки (МСК) — все клетки соединительной ткани и т. д. Детальная характеристика отдельных типов региональных СК будет приведена в соответствующих разделах, здесь же мы остановимся на некоторых общих свойствах НСК, ГСК и МСК, полученных из различных источников.

2.2. Нейральные стволовые клетки

Нейральные СК (НСК) способны к самообновлению и образованию как нейронов, так и клеток глии (астроциты и олигодендроциты) [158, 256]. Было показано, что НСК могут быть очищены от прочих клеток мозга человека, применяя комбинацию антител против антигенов CD133 и CD24 [758]. CD24 представляет собой термоустойчивый гликопротеин, известный также как Heat Stable Antigen (HSA), который экспрессируется на поверхности В-лимфоцитов и дифференцирующихся нейробластов. CD133⁺CD24⁺ клетки образовывали нейросферы, которые сохраняли жизнеспособность в культуре и могли вызывать продукцию астроцитов, олигодендроцитов и нейронов как *in vitro*, так и *in vivo*. Изучение ретровирусного маркирования позволило ис-

следователям продемонстрировать, что одиночная НСК может вызвать образование множества дочерних клеток, каждая из которых способна дифференцироваться в астроциты, олигодендроциты и нейроны [257]. У взрослых НСК обнаруживаются в 2-х основных нейрогенных регионах — гиппокампе и субвентрикулярной зоне [256, 493, Rao M. S., et al., 1999], а также в «реликтах» нейроэпителия, сохраняющегося в спинном мозге [25, 729]. В адгезивных культурах НСК образуют большие клоны, содержащие нейроны, глию и большое число прогениторных клеток, которые чаще всего идентифицируются ретроспективно на основе поведения после выделения. Нейросферы, происходящие из различных регионов ЦНС, характеризуются выраженной морфологической гетерогенностью и экспрессируют маркеры, соответствующие региону. СК из различных нейральных регионов образуют потомство, характерное для этого региона. Разные типы нейральных клеток появляются с определенной временной последовательностью, которая типична для данного региона и вида. В прогениторных клетках закодирована как позиционная, так и временная информация, но СК могут проявлять стадиозависимое изменение потенциала. Некоторые ранние клетки нервной трубки образуют СК как ЦНС, так и периферической нервной системы, что позволяет предполагать наличие для двух разных линий СК общего предшественника. Авторы работы [25] считают, что НСК способны образовать клетки всех трех зародышевых листков, хотя строгих доказательств этому пока не много.

НСК были опробованы в лечении ряда тяжелых заболеваний нервной системы у человека: болезни Паркинсона, Гентингтона, Альцгеймера — и повреждений спинного мозга на животных моделях. Результаты этих исследований, подробно изложенные, в частности, в отечественных монографиях [15, 11, 37, 12], предполагают наличие у НСК потенциала для дифференцировки в нейральные клеточные типы внутри поврежденной зрелой нервной системы. НСК предпочтительнее дифференцируются в астроциты как *in vitro*, так и при трансплантации. Однако в последнее время были разработаны несколько молекулярных методов, способных стимулировать нейрональную дифференцировку во время развития НСК. Например, трансдукция СК нейрогенином 2 в системе *in vitro* позволяет в 95 % случаев добиться дифференциации этих клеток в нейроны [Falk A., et al., 2002] и после трансплантации повышает образование прогениторных нейрогенных клеток из краниального сенсорного ганглия [Fode C., et al., 1998].

2.3. Гемопозитические стволовые клетки из различных источников

Типичным примером региональных СК являются гемопозитические стволовые клетки (ГСК), которые могут, подвергаясь асимметричным самообновляющимся клеточным делениям, образовывать все элементы крови, реконструировать кроветворную систему при трансплантации летально облученным реципиентам, а также разрастаться и дифференцироваться в организме животных, даже если реципиент не был облучен [510, Yang A., et al., 2000]. У мышей выделены популяции ГСК, очищенные почти до однородного состава. Они характеризуются следующим набором поверхностных антигенов: CD45⁺, Thy 1.1⁺, c-kit⁺ и SCA-1⁺ при отсутствии экспрессии значительных уровней CD34 и линейных тканеспецифических антигенов. К линейным (lineage, Lin) маркерам кроветворения относят гликофорин А (GPA), CD3, CD4, CD8, CD10, CD14, CD16, CD19, CD20 [42]. У человека ГСК также не экспрессируют линейных антигенов и являются позитивными на CD45 и Thy-1 [Alison M. R., et al., 2000]. Однако, в отличие от мыши, большая часть ГСК у человека представлена во фракции CD34⁺ и не экспрессирует CD38 антиген. Неизвестно, можно ли ГСК человека очистить до такой же гомогенности, как ГСК мыши, но для получения кроветворного потомства человека необходимо ввести иммунодефицитной мыши или в плод овцы не менее 200–500 очищенных CD34⁺ клеток человека [745]. Неизвестно, обусловлено ли это ксеногенной природой системы определения или отражает недостаточную чистоту исходного препарата.

Первое доказательство, что ГСК могут дифференцироваться в разные линии кроветворных клеток, получили, изучая результаты трансплантации одиночной стволовой клетки. Альтернативный метод маркирования клеток путем введения в них гена ретровирусного вектора был

разработан позже. Так как искусственно сконструированный, неспособный к размножению ретровирус внедряется в ДНК клетки произвольно в одном из тысяч возможных мест встраивания (сайтов интеграции), это место включения позволяет потом отследить как саму клетку, так и ее потомков. Последовательность ДНК, обеспечивающая целостность вектора, является специфической для этой клетки и может быть передана ее потомству *in vivo* или *in vitro*. Такой подход был применен, чтобы продемонстрировать, что одна единственная гемопоэтическая стволовая клетка как у мыши, так и у человека может вызвать образование многих потомков [Szilvassy S.J., et al., 1989, 541]. Кроме того, этот подход позволил показать, что каждая ГСК подвергается самообновляющимся клеточным делениям и что множественные дочерние клетки имеют мультилинейный потенциал дифференцировки [Szilvassy S.J., et al., 1989]. Со временем такие же критерии были применены для идентификации других региональных СК.

Наиболее широко используемым методом идентификации ГСК является определение колониеобразующих клеток. В 1961 г. канадские ученые Till и MacCulloch [Till J.E., McCulloch E.A., 1961] предложили метод *ex vivo*, основанный на том, что после введения летально облученным мышам донорского костного мозга в их селезенке развиваются макроскопические колонии кроветворных клеток. Далее с помощью метода хромосомных маркеров они показали [Becker A.J., et al., 1963], что каждая такая колония представляет собой клон — потомство одной клетки, названной колониеобразующей единицей в селезенке (КОЕ-С). При образовании колонии одна КОЕ-С продуцирует несколько тысяч дифференцированных клеток-потомков, одновременно поддерживая собственную линию колониеобразующих клеток, которые при ретрансплантации следующей облученной мыши снова дают кроветворные колонии в ее селезенке. Количество так называемых колониеобразующих единиц (КОЕ) или колониеобразующих клеток (КОК) коррелирует с количеством ГСК в клеточной суспензии. Определение размера и состава колоний позволяет сделать заключение о степени зрелости и направлении дифференцировки прогениторной клетки. По мере повышения коммитированности общее количество СК и число типов клеток в колонии снижается. Эти и собственные данные позволили И. А. Черткову и А. И. Воробьеву разработать схему кроветворения [Чертков И. Л., Воробьев А. И., 1973], которая не потеряла своей актуальности и по сегодняшний день. В опубликованной в 1978 г. монографии З. А. Бутенко [Бутенко З. А., 1978] были подытожены данные о цитоморфологических признаках предполагаемых «кандидатов» в стволовые гемопоэтические клетки, была показана их гетерогенность.

В настоящее время основным методом идентификации ГСК является способность образовывать колонии взрослых клеток крови в культуре *in vitro*. Исследования образующихся колоний, проведенные в 70–80-х годах, позволили идентифицировать и количественно оценить несколько типов клеток-предшественников различной степени коммитированности. Определение колониеобразующей активности позволяет оценить степень коммитированности кроветворных клеток и направление их дифференцировки. Клоногенная активность определяется в полутвердых средах (метилцеллюлоза, агар, плазменный гель или фибриновый сгусток), которые, с одной стороны, уменьшают подвижность клеток, а с другой — предотвращают их прикрепление к поверхности стекла или пластика. Эти два условия необходимы для того, чтобы из одиночной клетки за 7–18 дней культивирования развились клоны, которые идентифицируются как одиночные кластеры (до 50 клеток) или колонии (более 50 клеток). Количество КОЕ не равно, но коррелирует с количеством ГСК в клеточной суспензии. Размер и состав колоний при культивировании в метилцеллюлозе позволяют определить степень зрелости и направление дифференцировки клетки-предшественника. По мере коммитированности общее количество клеток и число типов клеток в колонии снижается. Например, ГСК или наиболее ранняя клетка-предшественник миелоидного ростка, неспособная к самообновлению, КОЕ-ГЭММ (CFU-GEMM) образует большую мультилинейную колонию, содержащую гранулоциты, эритроциты, моноциты и мегакариоциты. Более коммитированная клетка — КОЕ-ГМ (CFU-GM) дает рост колонии, содержащей гранулоциты и макрофаги, а КОЕ-Г (CFU-G) — в культуре дает мелкую колонию зрелых гранулоцитов. Предшественники эритроцитов образуют 2 типа колоний: ранний предшественник

образует крупные БОЕ-Э (BFU-E, бурстобразующую единицу эритроцитов), а более поздний — мелкие КОЕ-Э (CFU-E). Таким образом, в полутвердой культуре можно идентифицировать 6 типов миелоидных колоний: КОЕ-ГЭММ, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-Э и БОЕ-Э.

Учитывая, что ГСК характеризуются наиболее высоким пролиферативным потенциалом и образуют большие по размеру колонии, по числу таких колоний можно косвенно оценить количество стволовых клеток. Так, авторы работ [Bertoncello I., et al., 1991, Holyoake T.L., et al., 1993] показали, что клетки, образующие колонии более 0,5 мм в диаметре и содержащие более 1000 клеток по устойчивости к около-летальным дозам 5-фторурацила и по способности репопуляции очень близки к ГСК.

Другой метод — долгосрочное культивирование — позволяет оценить количество клеток, «иницирующих» долговременную культуру (long-term culture-initiating cell, LTC-IC). Метод основан на наблюдении, что стромальные клетки костного мозга и/или определенная композиция ростовых факторов способны в течение не менее 5 недель долговременной культуры (long-term culture, LTC) поддерживать жизнеспособность и колониеобразующую активность клеток-предшественников. Учитывая, что время жизни коммитированных КОЕ в культуре ограничивается тремя неделями, клетки, способные образовывать колонии после 5 недель культивирования, могут быть использованы для определения количества LTC-IC. Установлено, что количество LTC-IC, определенное таким образом, является близким функциональным аналогом ГСК: они характеризуются высоким репопуляционным потенциалом, их значительная часть (около 20 %) имеет фенотип CD34⁺ CD38⁻ и способна к самообновлению [Petzer A.L., et al., 1996]. Частота встречаемости LTC-IC в костном мозге человека составляет 1:50000. Однако наиболее близким аналогом ГСК, очевидно, следует считать миелоид-лимфоид-иницирующую клетку, полученную через 15 недель культивирования в условиях близких к LTC. Эти клетки встречаются в 10 раз реже LTC-IC и способны давать рост клеткам как миелоидного, так и лимфоидного ростков кроветворения [Lemieux M.E., et al., 1996, Punzel M., et al., 1999].

Domen и Weissman [207] предлагают репопуляционный подход идентификации СКК (рис. 2.1), различая долговременную ГСК (long-term hematopoietic stem cell, LT-HSC), способную восстановить кроветворную систему на протяжении всей жизни, и кратковременную ГСК (short-term hematopoietic stem cell, ST-HSC), выполняющую эту функцию в течение ограниченного времени.

ГСК могут быть получены из нескольких онтогенетических и анатомических источников: желточного мешка, региона аорта — гонады — мезонефрос (AGM), плодовой печени пуповинной крови, костного мозга, периферической крови. Кроветворные клетки желточного мешка имеют очень ограниченный дифференцировочный потенциал *in vitro* и неспособны к долговременному восстановлению гемопоэза при трансплантации [Born W., et al., 1988]. Полагают, что эти клетки не являются предшественниками ГСК, которые появляются несколько позже, у человека на 3–5-й неделе, сначала в месте, где начинает формироваться желудок и впервые образуется эндотелий кровеносных сосудов (para-aortic splanchnopleura), а затем в регионе AGM [22]. Начиная с 6-й недели, ГСК сосредотачиваются в печени, которая до самого рождения становится основным кроветворным органом плода. До 18-й недели, когда кроветворение начинает также отмечаться в КМ, более 60 % клеток печени вовлечены в выполнение кроветворной функции. Поскольку до 13-й недели развития у плода человека отсутствует тимус и, соответственно, Т-лимфоциты [Pahal G.S., et al., 2000], трансплантация клеток фетальной печени 6–12-й недели гестации не влечет за собой развитие РТПХ и не требует подбора гистосовместимого донора [22]. Этот постулат подтвержден на всех исследованных видах животных: мышах, крысах, свиньях, овцах, лошадях и приматах [466].

Фетальная печень по сравнению с другими источниками кроветворения характеризуется самым высоким содержанием ГСК [785]. В табл. 2.1 представлено сравнительное содержание предшественников кроветворных клеток в популяции мононуклеаров из различных источников кроветворения [22]. При этом до 30 % CD34⁺ клеток фетальной печени являются CD38⁻.

По мере развития плода с 7-й до 17-й недели количество ГСК постепенно снижается, а количество В-лимфоцитов линейно увеличивается в среднем на 1,1 % в месяц [Pahal G.S., et al., 2000].

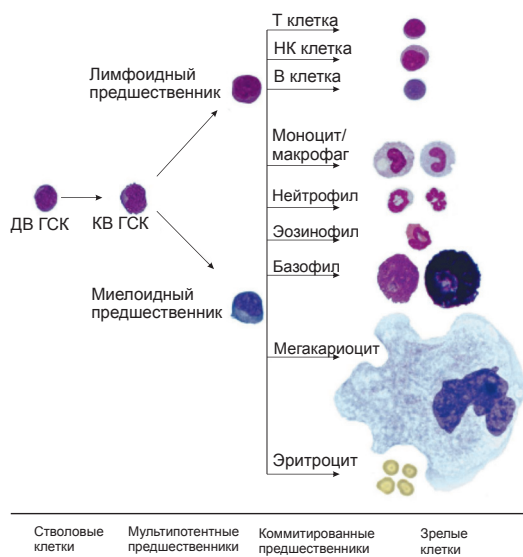


Рис. 2.1. Схема кроветворения по Domen и Weissman [207].

Обозначения: ДВ-ГСК — долговременная ГСК (LT-HSC), КВ-ГСК — кратковременная ГСК (ST-HSC)

Таблица 2.1
Процентное содержание $CD34^{+}$ и $CD34^{+}CD38^{-}$ клеток в популяции мононуклеаров из различных источников кроветворения

Источник клеток	$CD34^{+}$	$CD34^{+}CD38^{-}$
Периферическая кровь*	0,4–1,6	0,0–0,4
Костный мозг	0,5–3,6	0,0–0,5
Кордовая кровь	0,1–2,6	0,0–0,6
Фетальная печень	2,3–25,8	0,2–12,5

Примечание: * — кровь обработана G-CSF

Фетальная печень отличается от остальных источников кроветворения высоким процентом недифференцированных клеток. При культивировании в присутствии ростовых факторов клетки фетальной печени фенотипа $CD34^{+} CD45Ra^{low} CD71^{low}$ образовывали колоний в 30 раз больше, чем аналогичные клетки кордовой крови и в 90 раз больше, чем КМ [Nicolini F.E., et al., 1999]. Особо выраженные различия обнаружили в количестве наиболее ранних предшественников, способных к образованию смешанных колоний CFU-GEMM. Их количество в фетальной печени было приблизительно в 60 и 250 раз выше, чем в кордовой крови и КМ, соответственно.

Было отмечено, что количество ГСК уменьшается в процессе развития плода. Содержание $CD34^{+}$ в кордовой крови линейно снижается в 5 раз в сроках от 20 недель гестации (при преждевременном прерывании беременности) до 40 недель (нормальные роды) при одновременном увеличении экспрессии маркеров дифференцировки [Surbek D. V., et al., 2000]. Колониеобразую-

шая активность клеток, полученных из печени плодов первого триместра гестации, была значительно выше, чем клеток второго триместра [22]. Таким образом, клетки фетальной печени ранних сроков (6–12 недель гестации) характеризуются не только более высоким содержанием КОЕ, но и обладают большей способностью дифференцироваться в различные типы клеток кроветворной системы, являясь наиболее богатым источником ГСК.

Несмотря на широкие вариации использованных маркеров и методов идентификации, следует признать, что ГСК является исключительно редкой клеткой и многие вопросы, связанные с ее самообновлением и направлением дифференцировки, остаются до сих пор открытыми.

2.4. Мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки из различных источников

Еще одним примером региональных СК из специализированных клеток зародышевых листков являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

Наиболее известным источником МСК является КМ. Но эти клетки могут быть выделены также из таких мест их постоянной локализации, как трабекулярная кость [543, 705, 757], надкостница [254, 531], жировая ткань [191, 214, 280, 796, 846, 847], скелетные мышцы [353, 829], легкие [542], синовиум [182], молочные зубы [756], пуповина [437, 644, 661], плацента [338], амниотическая жидкость [337], фетальные ткани [Lucas P.A., et al., 1995; Петренко А. Ю. и др., 2007; Петренко А. Ю. и др., 2008; Скоробогатова Н. Г. и др., 2008; 338, 830]. У мышей МСК выделяли из ткани головного мозга, тимуса, печени, селезенки, почки, мышц, легких, а также жировой ткани, сухожилий и синовиальных мембран [534, 841]. Эти данные показывают, что МСК широко и разнообразно распределены в организме и могут занимать ниши, формирующиеся в разных условиях.

Приоритет открытия МСК принадлежит Александру Яковлевичу Фриденштейну и сотрудникам руководимой им лаборатории иммуноморфологии Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея. В работах Фриденштейна А. Я. и его сотрудников, проведенных в 60–80-х годах прошлого века, было установлено, что строма КМ взрослого человека содержит клоногенные мультипотентные адгезивные фибробластоподобные клетки (ФБПК), которые были названы колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕф) [Лурия Е. А. и др., 1966]. Авторы разработали методы культивирования этих клеток, показали, что при трансплантации под капсулу почки из них формируется кость [Фриденштейн А. Я. и др., 1968, Фриденштейн А. Я. и др., 1973]. Позже ученые этой лаборатории доказали, что в КМ присутствуют не только предшественники костной ткани, но и клетки, дифференцирующиеся в клетки хряща и жира [Фриденштейн А. Я. и др., 1986]. Работы лаборатории Фриденштейна А. Я. заложили основу идентификации и исследования МСК.

ФБПК вызывают интерес исследователей по ряду причин: они относительно легко выделяются, размножаются и дифференцируются в культуре, способны выполнять функцию фидерных клеток при выращивании ЭСК и ГСК, могут явиться основой для создания биоинженерных конструкций соединительной ткани.

В КМ взрослого человека ФБПК содержатся в концентрации от 0,01 % до 0,001 % [134], а у мышей одна ФБПК приходится на 11300–27000 ядерных клеток. В недифференцированном состоянии ФБПК имеют веретенообразную форму и напоминают фибробласты. При культивировании ФБПК проявляют наличие высокого, но очень изменчивого потенциала экспансии. Иногда они обеспечивают 15 и более делений, в других же случаях прекращают репликацию после 4-х делений [125, 198, 592]. Природа такой изменчивости может быть обусловлена рядом слагаемых, в числе которых может быть и различие методов, примененных для выращивания клеток, и состояние здоровья донора, и низкая частота клеток-предшественников в исходном материале (например, в пунктатах КМ она может составлять 2–5 клеток на 10^6 моноклеаров).

Было показано, что на скорость пролиферации существенно влияет плотность посева. По данным Colter и др. [163], при первичном пассаже наиболее быстро ФБПК из КМ человека растут при

низкой концентрации клеток. В этом случае они образуют большие колонии, состоящие из клеток, имеющих Лаг фазу продолжительностью около 5 дней, за которой следует такой же продолжительности логарифмическая фаза быстрого роста, переходящая в стационарную фазу. Было отмечено, что число колоний, образующихся из сотни засеянных клеток, остается постоянным при варьировании плотности посева от 0,5 до 12 клеток/см². Однако величина колоний заметно снижается при возрастании плотности посева. На величину колоний не влияет периодичность смены питательной среды: каждый второй день или раз в 10 дней. Но выход клеток снижается по мере уменьшения размеров колоний. При посеве клеток с низкой плотностью их содержание увеличивалось за 10 дней в 2000 раз. Напротив, клетки, посеянные с более высокой плотностью, амплифицировались только в 60 раз. Предполагают, что замедленный рост клеток при высокой плотности посева обусловлен или контактом клетки с клеткой или факторами, которые клетки секретируют в среду. Интересно, что ФБПК, размножаемые в культуре повторными пассажами при низкой плотности, продолжали расти до 50-й популяции. Тогда как ФБПК, пассируемые при высокой плотности (до 5000 клеток/см²), прекращали свой рост после 15 делений [163].

Было установлено, что пролиферацию ФБПК стимулируют такие ростовые факторы, как PDGF, EGF, bFGF, TGF- β и инсулиноподобный ростовой фактор-1 [89, 281, 415]. Напротив, цитокины, такие как IL-4 и интерферон- α , подавляют их развитие [780].

По мере изучения ФБПК была установлена их способность к мультилинейной дифференцировке в различные типы клеток мезенхимальных тканей. Поэтому в более поздней литературе термины «колониобразующая единица фибробластов» (КОЕ-Ф) или «ФБПК», характеризующие только ранние стадии развития описываемых клеток не отражая типобразующих признаков, были вытеснены другими терминами, такими как «мезенхимальные стволовые клетки» или «мезенхимальные прогениторные клетки». В КМ и других мезенхимальных тканях довольно редкие клетки, проявляющие способность к дифференцировке более чем в одном направлении и способные обеспечить самообновление путем асимметричного деления, получили название мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [Caplan A. I., et al., 1991]. МСК распределены среди более многочисленных мезенхимальных прогениторных клеток (МПК), размножающихся уже симметричным делением, но также обладающих потенциалом к мультилинейной дифференцировке в мезенхимальные ткани [176, 548].

Определить представленность МПК и МСК внутри исследуемых популяций оказалось довольно сложно. В свое время авторы работ [828, 829] предложили метод разделения этих клеток, основанный на различной экспрессии поверхностных маркеров в ответ на обработку инсулином или дексаметазоном. Было показано, что инсулин (2 мкг/мл) ускоряет фенотипическую экспрессию МПК, но не влияет на индукцию фенотипа МСК. Напротив, дексаметазон (в концентрациях от 10^{-10} до 10^{-6} М) индуцирует линейную коммитированность МСК, но не изменяет фенотипическую экспрессию МПК. Следовательно, если в культуре находятся только МПК, после обработки дексаметазоном не будет выявлено различий в количестве и качестве фенотипов, а после обработки инсулином в таких культурах будет обнаружена экспрессия многочисленных фенотипов. В случае смешанной культуры, содержащей как МПК, так и мультипотентные СК, будет отмечено более высокое количество экспрессированных фенотипов и разнообразие их качеств после обработки дексаметазоном. В популяциях стромальных клеток, происходящих из дермы и скелетных мышц плодов, взрослых лиц и стариков, были обнаружены как МПК (с морфологией, подверженной влиянию инсулина), так и МСК (с морфологией, изменяемой дексаметазоном) [830].

Другой способ разделения МСК и МПК основывался на свойстве МСК исключать красители родамин 123 и Hoechst 33342. В лаборатории Quesenberry [166, 605, 606, 608] клетки КМ мышей B6.SJL и BALB/c культивировали *in vitro* с тромбопоэтином, FLT-3 лигандом, а также SCF и определяли на протяжении клеточного цикла способность к экспансии колониобразующих МПК. Одновременно у линейно негативных (Lin-) МСК с низким уровнем накопления родамина и Hoechst определяли фазу клеточного цикла, а также включение меченого тимидина. На протяжении первого клеточного цикла была выявлена обратная взаимосвязь между разрастаниями

МПК и МСК, которая повторялась при последующих делениях. Инверсии МПК и МСК постоянно отмечались при культивировании в течение 28–32 часов, представляющих раннюю S фазу. За время первого клеточного цикла насчитали 13 больших обратимых повышений численности МПК, которым соответствовали 11 больших снижений численности МСК, а в 2-х оставшихся случаях содержание МСК было на базальном уровне. Таким образом авторы показали перемещение мезенхимальных клеток без какой-либо дифференцировки из субпопуляции МСК в субпопуляцию МПК и обратно, тогда как иерархических взаимоотношений этих двух групп клеток не наблюдали. Было заключено, что в различных обратимых функциональных состояниях МПК и МСК являются на самом деле одними и теми же клетками, т. е. региональные СК могут непрерывно изменять свой фенотип и быть МПК в одной фазе цикла и МСК — в другой фазе.

Учитывая сложность разделения МСК и МПК, многие исследователи их стали объединять в одну группу, обозначая как МПК/МСК или МС/ПК. Недавно свою позицию по этому вопросу изложило Международное общество клеточной терапии (International Society of Cellular Therapy, ISCT). В специальной статье [327], посвященной анализу современного состояния проблемы, рекомендуется обозначать колониеобразующие фибробластоподобные, адгезирующие к пластику клетки, независимо от источника их получения, как «мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки» (МСК). Несмотря на то, что МСК в предложенном, более широком понимании включает как истинные мезенхимальные стволовые клетки, так и мезенхимальные прогениторные клетки, ISCT определил ряд критериев, которые позволяют четко отличать эти клетки от других. Минимальные критерии, позволяющие идентифицировать МСК, помимо вышеуказанных свойств, включают специфический иммунофенотип и трехлинейную дифференцировку.

2.4.1. Фенотип МСК

Выделение и характеристика МСК требует разработки панели специфических поверхностных маркеров. В этом направлении проведена большая работа, в результате которой наработано много моноклональных антител. Однако до настоящего времени получение «чистых» популяций мультипотентных МСК на основании одного маркера остается несбывшейся мечтой. Наибольшее приближение к желаемому достигается применением моноклонального антитела к антигену Stro-1 [692]. Хотя эпитоп Stro-1 остается неизвестным, установлено, что он распознает антиген клеточной поверхности, устойчивый к трипсину.

Вслед за антигеном Stro-1 было получено моноклональное антитело SB-10, реагирующее с антигеном, который содержится в покоящихся недифференцированных МСК, но исчезает, когда появляется экспрессия ЦФ и клетка переходит на остеогенный путь развития. Этот специфический антиген SB-10 получил название activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM или CD166) [127], но значение его в остеогенной дифференцировке МСК остается неизвестным. Позже было получено моноклональное антитело SH-2 [306], реагирующее с эпитопом рецептора TGF- β (CD105) МСК человека. Антитела SH3 и SH4 определяют различающиеся эпитопы экто-5'-нуклеотидазы (CD73), связанной с мембраной МСК.

При световой микроскопии культуры МСК представляются в виде однородных популяций веретенообразных ФБПК. В присутствии ЭТС или таких ростовых факторов, как PDGF, bFGF, TGF- β и EGF они способны образовывать колонии, состоящие из 30–100 клеток. Фенотипический анализ, проведенный на 14-й день, показал, что эти клетки дают положительное окрашивание на антигены SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 и другие поверхностные белки [593]. В работах других исследователей отмечалась экспрессия на МСК КМ человека антигенов CD34 [777, 830], CD105 [78], CD51 и CD56 [688], а также CD10, CD13 и HLA класса I [829]. По данным Young et al. [830], популяции МСК взрослых лиц и стариков экспрессировали на клеточной поверхности как CD34, так и CD90, тогда как предполагаемые СК плодов экспрессировали только CD90. Изменение фенотипических свойств МСК с возрастом сопровождается снижением их общего количества. Функциональное значение экспрессии

маркера CD34 на МСК остается неясным и даже сомнительным, поскольку кроветворные клетки, несущие маркеры CD34, CD14 и CD45 в культурах МСК обычно не обнаруживаются.

Ценная информация была получена авторами работ [474, 475] при системном анализе молекул клеточной поверхности МСК. Было установлено, что МСК экспрессируют широкий спектр молекул клеточной адгезии, которые имеют значение в осуществлении клеточного взаимодействия и хоуминга. МСК проявляют высокую экспрессию интегринов $\alpha 1$, $\alpha 5$ и $\beta 1$ (CD29); низкую экспрессию $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, αV , $\beta 2$ и $\beta 4$ и не экспрессируют $\alpha 4$, αL и $\beta 2$. Эти данные, указывающие на некоторые ключевые механизмы взаимодействия МСК с другими типами клеток, к сожалению, пока не были проверены в системе *in vivo*.

Таблица 2.2

Фенотипическая характеристика культур мезенхимальных стволовых клеток человека

Общее название	CD локус	Определение
Молекулы адгезии		
ALCAM	CD166	+
ICAM-1	CD54	+
ICAM-2	CD102	+
ICAM-3	CD50	+
Е-селектин	CD62E	–
L-селектин	CD62L	+
P-селектин	CD62P	–
LFA-3	CD58	+
Кадгерин 5	CD144	–
PECAM-1	CD31	–
NCAM	CD56	+
HCAM	CD44	+
VCAM	CD106	+
Рецептор гиалуроната	CD44	+
Рецепторы факторов роста и цитокинов		
IL-1R (α и β)	CD121a, b	+
IL-2R	CD25	–
IL-3R	CD123	+
IL-4R	CD124	+
IL-6R	CD126	+
IL-7R	CD127	+
Интерферон γ R	CDw119	+
TNF- α -1R	CD120a	+
TNF- α -2R	CD120b	+
FGFR		+
PDGFR	CD140a	+
Рецептор трансферрина	CD71	+
Интегрины		
VLA- $\alpha 1$	CD49a	+
VLA- $\alpha 2$	CD49b	+
VLA- $\alpha 3$	CD49c	+
VLA- $\alpha 4$	CD49d	–

Общее название	CD locus	Определение
VLA- α 5	CD49e	+
VLA- α 6	CD49f	+
VLA- β цепь	CD29	+
β 4 интегрин	CD104	+
LFA-1 α цепь	CD11a	–
LFA-1 β цепь	CD18	–
Vitronectin R α цепь	CD51	–
Vitronectin R β цепь	CD61	+
CR4 α цепь	CD11c	–
Mac 1	CD11b	–
Дополнительные маркеры		
T6	CD1a	–
CD3 комплекс	CD3	–
T4, T8	CD4, CD8	–
Tetraspan	CD9	+
LPS рецептор	CD14	–
Lewis X	CD15	–
-	CD34	–
Общий антиген лейкоцитов	CD45	–
5' терминальная нуклеотидаза	CD73	+
B7-1	CD80	–
HB-15	CD83	–
B7-2	CD86	–
Thy-1	CD90	+
Эндоглин	CD105	+
MUC18	CD146	+
BST-1	CD157	+

По Deans и Moseley [181]

Deans и Moseley [181], обобщив результаты ряда работ, представили наиболее полную панель маркеров МСК (табл. 2.2). Видно, что МСК после экспансии экспрессируют широкий спектр молекул адгезии, рецепторов ростовых факторов и других биомолекул, которые могут быть использованы для их идентификации. Следует отметить, что этот спектр был бы значительно шире, если бы клетки для анализа были взяты до пассирования, так как в ходе экспансии фенотип МСК становится более однородным. Так, Pittenger et al. [593, 594] показали, что уже в первичной культуре мононуклеаров костного мозга, начиная с 5-х суток культивирования, наблюдалось увеличение относительного содержания CD73⁺CD105⁺CD34[–]CD45[–] клеток, и данный фенотип преобладал при последующем культивировании до 12-го пассажа. При цитофлуориметрическом анализе 4-го и 5-го пассажей культуры фибробластоподобных клеток, выделенных из костного мозга, была показана негативная экспрессия этими клетками маркеров CD45, CD19 CD3, CD14, Flk-1 и позитивная экспрессия Sca-1, CD105 и CD29 [Pr J. E., et al., 2007]. При этом содержание CD29⁺ клеток составляло 99 % на протяжении 5-ти пассажей.

Несмотря на относительную однородность МСК после экспансии их фенотип, определенный в различных лабораториях с использованием разных поверхностных маркеров, существенно отличается. Использование различных панелей поверхностных маркеров не позволяет сравнить МСК с близкими свойствами, изолированные и размноженные разными методами, а также полу-

ченными из различных источников. В связи с чрезвычайной важностью вопроса об эквивалентности МСК из различных источников для клинического использования Международное общество клеточной терапии разработало минимальные критерии [209], которые помимо адгезии, способности к колониообразованию и индуцированной трехлинейной дифференцировке включают специфический иммунофенотип. В соответствии с этими критериями, МСК после экспансии должны быть позитивны на CD105 (эндоглин, распознается моноклональным антителом SH2), CD73 (экто 5'-нуклеотидаза, распознается моноклональными антителами SH3 и SH4) и CD90 (Thy1). Одновременно МСК не должны экспрессировать CD34 (маркер гемопоэтических предшественников и эндотелиальных клеток), CD45 (пан-лейкоцитарный маркер), CD14 и CD11b (экспрессируются на моноцитах и макрофагах), CD79a и CD19 (маркеры В-лимфоцитов), а также HLA-DR. Принятие в качестве основы вышеописанных критериев позволит исследователям из различных лабораторий объединить усилия для более глубокого изучения и стандартизации МСК из различных источников, что ускорит проведение доклинических испытаний и разработку методов лечения на основе МСК.

2.4.2. Ортодоксальная дифференцировка МСК

Дифференцировочный потенциал МСК интенсивно изучается в течение последнего десятилетия. Показана их способность дифференцироваться в клетки кости, хряща, жира, мышц, эндотелия, мозга, печени, сердца, поджелудочной железы и т. д. В настоящем разделе мы рассмотрим первые три направления дифференцировки МСК, называемые ортодоксальными. Они могут развиваться спонтанно при культивировании, особенно в условиях высокой плотности клеток. В настоящее время разработаны условия культивирования, при которых удастся направить процесс дифференцировки МСК по определенному пути и клетки могут претерпеть адипогенную дифференцировку, проявляющуюся появлением капель жира, хондрогенную дифференцировку, выявляемую окрашиванием на коллаген типа II, или остеогенную, которую определяют окрашиванием на щелочную фосфатазу (ЩФ) и кальций.

Остеогенная дифференцировка МСК происходит при наличии в среде β -глицерофосфата, дексаметазона и ЭТС. При культивировании в монослое с этими добавками МСК приобретают остеобластную морфологию с повышением активности ЩФ и отложением минерализованного экстраклеточного матрикса. Хондрогенная дифференцировка отмечается при культивировании МСК в определенных условиях, основу которых составляет наличие трехпространственного матрикса и бессывороточной среды, содержащей TGF- β (предпочтительнее TGF- β 2 или - β 3). Хондрогенез редко обнаруживается при трансплантации клеток в открытых системах (подкожно или под капсулу почки), тогда как его часто наблюдают в закрытых системах (диффузионные камеры или в микромассе культуры клеток стромы *in vitro*). Предполагают, что решающее значение для хондрогенеза имеет локальное низкое напряжение кислорода [92]. В этих условиях клетки быстро теряют свою фибробластоподобную морфологию, включают биосинтез сульфатированных гликозаминогликанов и начинают экспрессировать компоненты экстраклеточного матрикса, специфические для хряща. Наиболее ранними компонентами экстраклеточного матрикса являются фибромодулин и декорин, участвующие в регуляции фибриллогенеза коллагена. В более поздние этапы хондрогенеза клетки синтезируют такие компоненты нормального суставного матрикса хряща как агрекан и коллаген типа II [79].

МСК, культивируемые в среде с изобутилметилксантином, дифференцируются в адипоциты, образующие большие вакуоли, наполненные жиром. Липогенную дифференцировку МСК индуцируют ядерные рецепторы (NF- κ B), активируемые каскадом индукции киназы (TAK1/TAB1/NF- κ B), рецепторами фактора транскрипции PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) и синтетазами жирных кислот. IL-1 и TNF- α подавляют липогенез с прямым переходом в остеогенез.

Следует заметить, что условия культивирования клеток могут стать критической детерминантой при определении дифференцировочного потенциала МСК. Кроме того, необходимо учиты-

вать возможность того, что трехлинейная дифференцировка обусловлена не мультипотентными МСК, а смесью коммитированных предшественников, каждый из которых имеет ограниченный потенциал дифференцировки.

2.4.3. Источники МСК

Во время эмбрионального развития млекопитающих, в том числе человека, возникновение первичной мезенхимы из ВМБ предстает первым эпизодом эпителиально-мезенхимальных превращений, которые затем становятся частым явлением при образовании и развитии новых тканей и органов. Хотя некоторые исследователи считают, что у взрослых особей такие превращения не происходят, выявление МСК в различных тканях и многочисленные сообщения о дифференцировке этих клеток во многие типы зрелых функционирующих клеток могут свидетельствовать о недооценке возможности мезенхимально-эпителиальных превращений в тканях взрослого организма. Альтернативным объяснением широкого распространения МСК в организме является их депонирование в КМ. Депонированные МСК разносятся с кровью по всему организму, колонизируя органы и ткани.

Действительно, строма КМ является самым богатым источником МСК. Из 10 мл пунктата КМ за два пассажа можно получить от 50 до 375×10^6 МСК [168]. Потенциал развития МСК похож на потенциал ГСК, но имеются и различия. Способность к самообновлению у МСК не проявляется так выражено, как у ГСК, у которых строгая потребность постоянного восстановления обусловлена высокой ежедневной потерей клеток крови (у человека от 109 до 1011 клеток на кг массы тела). У потомков МСК такой постоянной потери клеток не происходит, и самообновляющую активность часто трудно заметить из-за низкого или нулевого обмена клеток.

У взрослых млекопитающих МСК удается выделить, очевидно, из любой ткани, где присутствует строма. В собственном исследовании [23] мы провели сравнительное изучение фенотипических характеристик и способности к мультилинейной дифференцировке МСК, выделенных из костного мозга, жировой ткани и кожи взрослого человека. Клетки костного мозга выделяли из фрагментов гребня подвздошной кости, жировую ткань получали в результате хирургического удаления жировых отложений в брюшной области и обрабатывали, как описано ранее [846], МСК из кожи получали после эксплантации на поверхность культурального пластика микрофрагментов дермо-эпидермального лоскута диаметром 3 мм. Стромальные клетки, полученные из всех трех тканей, культивировали в питательной среде, дополненной эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота, 2 мМ L-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина в течение 3–4 пассажей со сменой среды 2 раза в неделю. Иммунофенотипический анализ субкультур проводили после 3–4 пассажей. Для этого суспензию культивированных клеток окрашивали моноклональными антителами CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC (Serotec), CD34 Class II-FITC, CD38-RPE (DAKO, Голландия), CD44-FITC, CD73-PE (BD Biosciences) и анализировали на проточном цитометре FACS Calibur (BD Biosciences, США). Для направленной дифференцировки в адипогенном направлении клетки, прошедшие 3–4 пассажа, помещали в адипогенную среду, содержащую 0,5 мМ изобутил-метилксантина, 1 мкМ дексаметазона, 10 мкМ инсулина, 200 мкМ индометацина. Через 2–3 недели накопление нейтральных липидов выявляли с помощью красителя Oil Red O. Для индукции дифференцировки в остеогенном направлении клетки помещали в остеогенную среду, содержащую 0,1 мкМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбата, 10 мМ β -глицерофосфата. Об эффективности изучаемой дифференцировки судили по реакции на щелочную фосфатазу и минерализации матрикса, которую оценивали по окрашиванию ализаринovým красным и по Ван Коссу.

Как видно из рис. 2.2, фибробластоподобные клетки, выделенные из КМ, жировой ткани и кожи человека после экспансии характеризуются иммунофенотипом, характерным для МСК. Они экспрессируют CD29, CD44, CD73 и CD105. При этом содержание клеток, экспрессировавших данные маркеры, составляет около 95 %. В то же время клетки, полученные из исследованных тканей взрослого человека, не экспрессируют маркер гемопоэтических стволовых клеток

и их ранних потомков (CD34, CD38), а также общий маркер гемопоэтических клеток — CD45. При помещении клеток, полученных из костного мозга, жировой ткани и кожи, в адипогенную среду приводило к изменению их морфологии, и через 2–3 недели в клетках обнаруживались характерные внутриклеточные сферические капли нейтрального жира, положительно окрашивающиеся красителем Oil Red O. Через 3 недели культивирования пассированных клеток из различных тканей в остеогенной среде клетки демонстрировали позитивное окрашивание на щелочную фосфатазу и были способны к минерализации матрикса, которая выявлялась по окрашиванию ализариновым красным и по Ван Коссу. Эти данные указывают на дифференцировку клеток в остеогенном направлении.

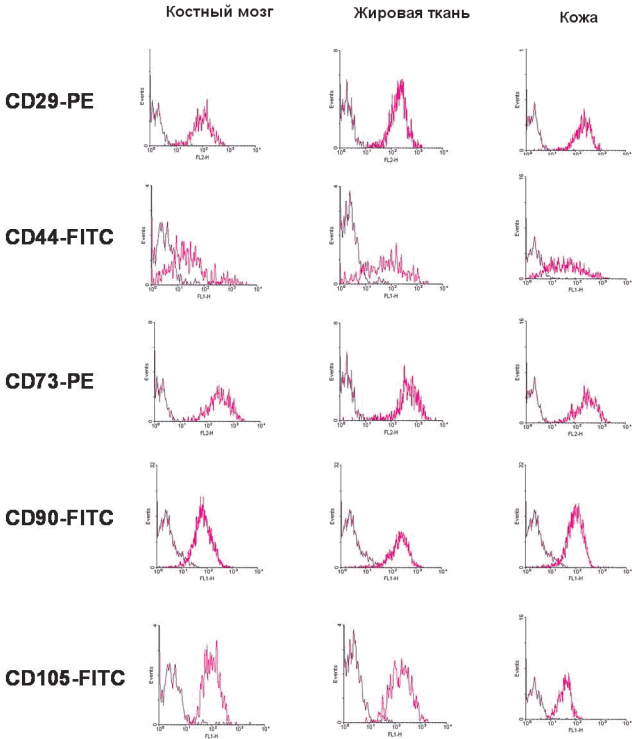


Рис. 2.2. Результаты проточной цитофлуориметрии стромальных клеток костного мозга, жировой ткани и кожи взрослого человека.

Клетки из всех исследованных источников позитивны на CD105, CD29, CD90, CD73, CD44 и негативны на CD34, CD45, CD38 (не показано)

De Ugarte et al. [191], проведя сравнительное изучение МСК из различных источников, также установили только небольшие различия между этими клетками, происходящими из КМ и жировой ткани, в отношении количественного выхода клеток, кинетики роста и старения, способности к мультилинейной дифференцировке и эффективности генной трансдукции. Мусина Р. А. и др. [19, 20] также не выявили принципиальных отличий между МСК, выделенными из разных тканей. Эти авторы обнаружили МСК в менструальной крови, содержащей кусочки эндометрия, отделяющегося во время кровотечения. Принадлежность клеток к МСК была установлена по основным поверхностным маркерам, морфологическим признакам и дифференцировочному потенциалу. Спецификой данного вида резервных СК является повышенная клоногенность и пониженная способность дифференцироваться в адипоциты. Проллиферативная активность МСК из менструальной крови была значительно более высокой по сравнению с МСК пуповинной крови или КМ.

В исследованиях других авторов также были выявлены некоторые различия в дифференцировочных потенциалах МСК из различных источников. Стромальные клетки КМ были более детерминированы к остеогенной дифференцировке; клетки жира — к адипогенной, а клетки дермы кожи имели примерно равный потенциал к индуцированной остеогенной и адипогенной дифференцировке [23, Петренко А. Ю. и др., 2007; Петренко А. Ю. и др., 2008; Скоробогатова Н. Г. и др., 2008].

Помимо тканей взрослого человека в качестве перспективного источника МСК для клеточной терапии рассматривается пуповинная (кордовая) кровь. В настоящее время пуповинная кровь является ценным источником ГСК. Во многих странах проводится широкомасштабный сбор кордовой крови, организация низкотемпературных банков для аутологичной трансплантации, а также формируются базы данных для подбора образцов от неродственных доноров для аллогенной трансплантации. Разработаны и опубликованы нормативные требования к организации и функционированию банков пуповинной крови, основные сведения о которых приведены в монографии Владимирской Е. Б. и др. [4]. Вместе с тем, Romanov и др. [644] показали, что из кордовой крови можно получить адгезивные фибробластоподобные клетки, которые образуют колонии и могут быть успешно размножены в культуре. Эти клетки не содержали антигенов, специфичных для эндотелия или лейкоцитов, но экспрессировали α -актин гладких мышц (α -ГМА), маркеры мезенхимальных клеток (фибронектин, коллаген типа I и VCAM-1) и были способны дифференцироваться в адипоциты и остеобласты.

Кордовая кровь может рассматриваться как кровь новорожденного, «мобилизованная» стрессом, связанным с родами [410]. Это объясняет, почему она обогащена не только ГСК, но также тканеккомитированными СК, которые рекрутируются во время родов из КМ плода и других тканевых ниш в фетальную кровь. Присутствие в кордовой крови негемопоэтических фибробластоподобных клеток было подтверждено и другими авторами [437]. Однако при культивировании этих клеток в оптимальных для роста условиях выявляли только скудный рост МСК [Hows J., et al., 2005]. Полученные адгезивные клетки имели моноцитарный иммунофенотип, проявляли экспрессию CD14 и CD45. При культивировании в индуцирующих средах эти клетки не проявляли способность дифференцироваться в остеобласты или адипоциты и не образовывали элементов зрелой стромы КМ. В недавно проведенном исследовании 25 образцов кордовой крови [Manca M. F., et al., 2008,] был подтвержден низкий выход МСК. Клетки, сходные с МСК КМ удалось получить лишь из двух образцов, причем они отличались друг от друга морфологией, фенотипом, скоростью роста, проявляли лишь остеогенную дифференцировку и, одновременно, — высокую способность к трансформации при культивировании. Таким образом, хотя в кордовой крови и присутствует небольшое количество МСК, их использование в клеточной терапии в ближайшее время весьма проблематично.

Значительное количество МСК выявляется в различных плодовых тканях, включая периферическую кровь. Так, при культивировании 10^6 ядерных клеток крови плодов человека первого триместра гестации от 7 до 14 недель гестации (средний возраст 10 недель ± 2 дня) образовывалось в среднем $8,2 \pm 0,6$ адгезивных фибробластоподобных колоний [134]. Частота образования таких колоний снижалась с повышением срока гестации. Эти колониеобразующие клетки были выделены и охарактеризованы. В недифференцированном состоянии они позитивны на CD29, CD44, SH2, SH3 и SH4, CD106, пролил-4-гидроксилазу, фибронектин, ламинин, виментин, α -ГМА. Так же, как МСК, полученные из взрослых тканей, клетки плодов не экспрессируют CD45, CD34, CD14, CD31, CD68, HLA-DR и фактора Виллебранда [134]. Отсутствие последнего антигена исключает связь этих клеток с эндотелием, а отсутствие CD45 антигена подтверждает их негемопоэтическое происхождение и отсутствие в популяции кроветворных клеток. При этом сортирование ФБПК методом проточной цитофлуориметрии (FACS) с антителом к антигену SH-3, определяющим эпитоп клеточной поверхности, присущий мезенхимальным прогениторным клеткам человека, показало, что содержание SH3⁺ клеток составляет $0,33 \pm 0,05$ % [134].

У плодов человека первого триместра МСК, помимо крови, содержатся в печени, костном мозге, мышечных тканях. По данным Campagnoli C. и др. [134], содержание колониеобразую-

щих единиц фибробластов (КОЕ-ф) в фетальной печени и костном мозге примерно одинаково; в печени КОЕ-ф составляет $11,3 \pm 2$ колонии/ 10^6 ядерных клеток, а КМ — $12,6 \pm 3,6$ колоний/ 10^6 ядерных клеток. При этом морфология, кинетика роста и иммунофенотип этих клеток такие же, как у МСК из периферической крови. В наших исследованиях [Грищенко В. И. и др., 2005] количество КОЕ-ф в первичной суспензии клеток фетальной печени первого триместра гестации было значительно выше — 28 ± 7 колоний/ 10^6 ядерных клеток. Эти различия могут быть связаны с различными условиями получения и выделения клеток. После экспансии колониеобразующих единиц в течение 4–5 пассажей они имели фенотип: CD29⁺, CD44⁺, CD105⁺, CD49⁺, HLA-ABC⁺, CD4⁺ CD33⁺, CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, HLA-DR⁺ [Петренко А. Ю. и др., 2007]. При культивировании в средах, индуцирующих дифференцировку, стромальные клетки фетальной печени проявляли способность к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях [Скоробогатова Н. Г. и др., 2008]. Следовательно, фетальная печень может рассматриваться не только как потенциальный источник ГСК, но и МСК для клеточной терапии.

Нами были выделены МСК из мышечных тканей плодов человека первого триместра гестации [Петренко А. Ю. и др., 2007]. Они имели фенотип CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD38⁺, который оставался стабильным в течение 20 пассажей. В ходе длительной экспансии клетки сохраняли способность дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях.

Авторам работы [134] выделить МСК из крови и органов плодов второго (от 14 до 25 недель) и третьего (от 38 до 40 недель) триместров гестации в тех же условиях не удавалось. Но после обогащения центрифугированием моноклеарных клеток и помещения их в культуру в концентрациях в 25 раз более высоких ($2,5 \times 10^6$ клеток/мл) развивались небольшие колонии адгезивных клеток. В недавно проведенной работе [Zhang Z. Y., et al., 2009] из КМ плодов человека второго триместра гестации были выделены МСК с характерным фенотипом и мультилинейным потенциалом дифференцировки.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что МСК фетального происхождения вызывают неоспоримый интерес для клеточной терапии и тканевой инженерии. Аналогично МСК, полученным из тканей взрослого организма, они характеризуются стабильным фенотипом и мультилинейным дифференцировочным потенциалом. Вместе с тем, фетальные МСК более примитивны, экспрессируют маркеры плюрипотентности (Oct 3/4, Nanog) [Zhang Z. Y., et al., 2009], быстрее пролиферируют в культуре и в меньшей степени экспрессируют антигены классов HLA I и HLA II.

Известно, что МСК, полученные от взрослых лиц, экспрессируют промежуточные уровни антигенов HLA класса I и низкие уровни антигенов HLA класса II [200, 829]. В связи с этим они могут опознаваться аллогенными лимфоцитами. Вместе с тем, МСК обладают иммуномодулирующим эффектом и *in vitro* способны подавлять пролиферацию активированных лимфоцитов [433, Петренко Ю. А., 2007] и функциональную активность зрелых Т клеток [389, 434]. Это подавление дозозависимое и отмечалось при любом источнике донорских клеток. Подавление активированных лимфоцитов выявляли также *in vivo*. Трансплантация бабуинам аллогенных МСК, не прошедших подбора по антигенам МНС, хорошо переносилось большинством приматов и вызывало у них длительное выживание трансплантатов кожи [193]. Было показано, что МСК образуют d-L-гиалуронидазу, арилсульфатазу, α - и β -глюкоцеребозидазу и адренолейкодистрофический белок. Предполагают поэтому, что эти клетки могут быть применены для трансплантации при таких нарушениях обмена, как синдром Гурлера (Hurler) [391]. Сообщали, что после трансплантации МСК человека в матку овцы отмечалось генерализованное разрастание этих клеток [469]. Таким образом, стало известно, что МСК имеют ряд особенностей, которые интересны в плане использования этих клеток для трансплантации.

Еще меньше известно о профиле генной экспрессии у МСК. Некоторые авторы [Tremain N. et al., 2001] сообщили, что в клоне, происходящем из культуры клеток стромы КМ, экспрессировано свыше 2000 транскриптов. В нескольких работах экспрессия генов МСК КМ [690] и кордовой крови [357, 571] была проанализирована серийным анализом генной экспрессии (SAGE). В куль-

тивированных клетках было выявлено большое число генов, и важную часть транскриптов клеток составляли экстраклеточные белковые продукты, молекулы адгезии, рецепторы ростовых факторов, гены белкового свертывания, восстановления ДНК, сигнала TGF- β и т. д.

2.4.4. Генетическая регуляция дифференцировки МСК в мезодермальные фенотипы

Модель дифференцировки МСК в мезодермальные фенотипы представили Baksh и др. [73, 74] (рис. 2.3). В соответствии с вариантом (А) этой модели МСК КМ обладают способностью дифференцироваться во все типы клеток соединительной ткани, включая кость, хрящ, сухожилие, связки, мышцы, жир и дерму. Более того, МСК имеют потенциал для самообновления и в определенных условиях окружения могут специализироваться по конкретному пути дифференцировки.

В соответствии с противоположным вариантом этой модели (В), строма КМ *in vivo* содержит клеточную популяцию, состоящую из клеток, имеющих различные потенциалы дифференцировки (квадри-, три-, би- и унипотентный). В процессе дифференцировки пролиферативный потенциал этих мезенхимальных клеток снижается.

Предполагается, что некоммитированные МСК до приобретения специфического фенотипа проходят две стадии, которые определяют их нахождение либо в популяции СК, либо в популяции коммитированных клеток. Среди СК мультипотентные МСК постепенно в процессе асимметричного деления (А) образуют менее потентные популяции. В то же время в мультипотентной популяции путем симметричного деления (S) образуются клетки-предшественники с меньшей самообновляющей способностью и более ограниченным потенциалом дифференцировки-конверсии. Среди коммитированных клеток эти три- и бипотентные клетки-предшественники продолжают симметричное деление и в подходящих условиях образуют би- или унипотентные клетки, из которых в конечном итоге возникают полностью дифференцированные клетки. Последние под индуктивным воздействием способны дедифференцироваться в более потентные клетки различных фенотипов (незакрашенные стрелки).

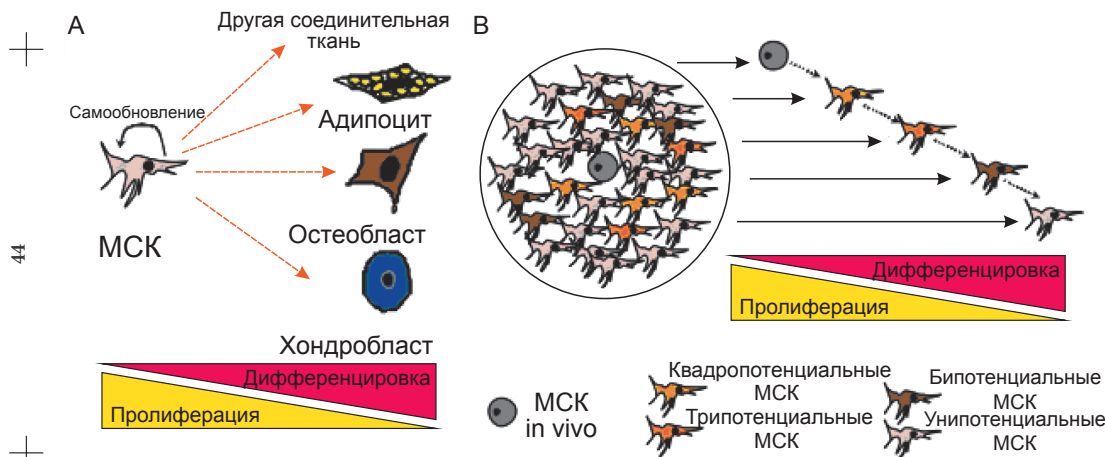


Рис. 2.3. Модели дифференцировки МСК (по Baksh и др. [74])

По представлению авторов, МСК, постепенно накапливающиеся среди коммитированных клеток, подвергаются транскрипционной модификации, превращаясь в клетки-предшественники, не имеющие еще выраженных изменений фенотипа и способности к самообновлению (рис. 2.4). Большинство МСК, культивируемых *in vitro*, до внесения в питательную среду ростовых факторов задерживается в фазах G0/G1 клеточного цикла. Затем клетки-предшественники претерпевают симметричное деление с образованием три- и бипотентных прогениторных клеток. Они

очень похожи на мультипотентные МСК и продолжают находиться среди СК, но уже отличаются наличием набора транскрипционных генов. Переход в другую популяцию коммитированных клеток происходит, когда клетки-предшественники, продолжающие делиться симметрично с образованием унипотентных клеток, приобретают специфические свойства линии, превращаясь в зрелые коммитированные клетки с характерным фенотипом. Подробно этот механизм еще не изучен. В частности, неизвестно, имеется ли общий регуляторный путь, функционирующий как «мастер-переключатель», для включения конверсии СК. Почему клетки-предшественники избирательно дифференцируются в какой-то один специфический фенотип, а не в любой другой? Могут ли прогениторные клетки изменять свою специфичность и фенотип? Сохраняется ли мультипотентность у полностью дифференцированных клеток?

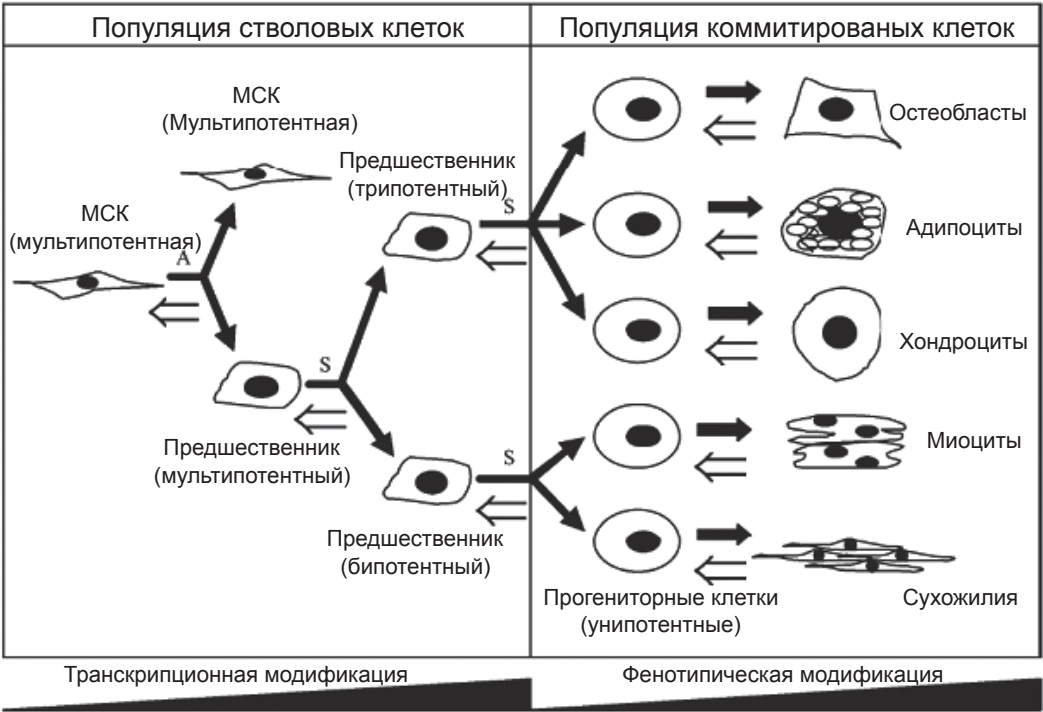


Рис. 2.4. Схематическая модель, представляющая дифференцировку-конверсию МСК
(по Baksh и др. [73, 74]. Пояснения — в тексте)

Дифференцировка-конверсия МСК в специфические зрелые клеточные типы является строго контролируемым процессом, происходящим с использованием активности различных транскрипционных факторов, цитокинов, ростовых факторов и экстраклеточных молекул матрикса. В настоящее время микротехнология ДНК позволяет идентифицировать гены, определяющие развитие специфичности и осуществление дифференцировки СК как функции различного индуктивного микроокружения. Такой подход был успешно применен для определения генов, регулирующих остеогенную, адипогенную и хондрогенную дифференцировку-конверсию МСК [205, 601]. Однако, хотя исследования, сконцентрированные на одной какой-либо линии, могут идентифицировать гены, имеющие значение для этой специфической линии, они часто не способны выявить гены, определяющие более чем одну линию дифференцировки, т. е. контрольные мастер-гены. Baksh и др. [74], используя модель генома человека Affymetrix U133, сравнили профили транскриптов, связанных, с одной стороны, с тремя мезенхимальными линиями, развивающимися из МСК человека (остеобластов, хондроцитов и адипоцитов), и, для сравнения, с некоммитированными МСК. Отмечали гены, экспрессия которых в процессе

дифференцировки-конверсии повышалась в 1,5 раза или выше, и подразделяли их на 3 группы в зависимости от участия в регуляции одной, двух или всех трех линий дифференцировки. Среди 39000 транскриптов, проанализированных на остеогенез, адипогенез и хондрогенез, повышали свою экспрессию только в клетках одной линии 914, 947 и 52 гена, соответственно, тогда как 235, 3 и 10 генов были причастны к повышению экспрессии в клетках двух линий (рис. 2.5).

Наиболее интересным оказалось выявление 8 генов, которые показывали повышение экспрессии в клетках всех трех линий. Было предположено, что эти гены являются контрольными мастер-генами. Они были идентифицированы как: период гомолог 1 (*PER 1*), nebullette (*NEBL*), молекула адгезии нейрональной клетки (*NRCAM*), связывающий белок 5 (*FKBP5*), рецептор типа II IL-1 (*IL1R2*), белок цинковых пальцев 145 (*ZNF145*), тканевой ингибитор металлопротеиназы 4 (*TIMP4*) и сывороточный амилоид A2. Функция этих генов распространяется на большую группу клеточных процессов, включающую клеточную адгезию, свертывание белка, организацию цитоскелета актина, а также воспалительную реакцию. Таким образом, предполагается, что инициация экспансии резервных СК и их регуляция является сложным процессом, требующим координации множества молекул и сигнальных путей. Для определения времени и способа включения этих генов в процесс дифференцировки — конверсии СК необходимо проведение функционального анализа.

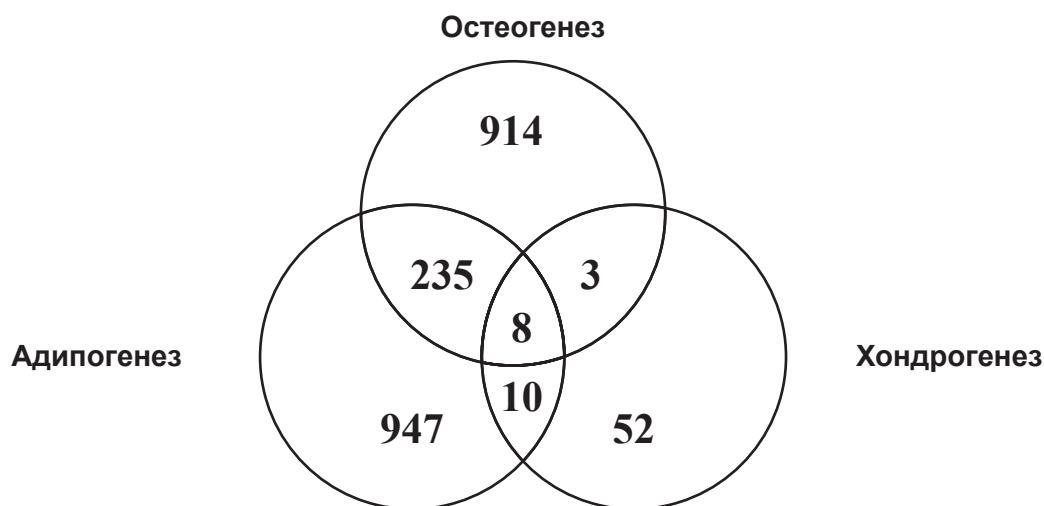


Рис. 2.5. Диаграмма, иллюстрирующая количество генов, участвующих в дифференцировке (конверсии) МСК в остеобласты (остеогенез), адипоциты (адипогенез) и хондроциты (хондрогенез). В перекрывающихся областях показано число генов, общих для двух или всех трех линий дифференцировки

В последние годы было показано, что резервные СК после трансплантации *in vivo* могут образовывать клетки, отличающиеся от их обычных потомков [160, 359, 840]. Song и Tuan [701] обнаружили, что происходящие из МСК полностью дифференцированные остеобласты, адипоциты и хондроциты под влиянием специфических внеклеточных стимулов могут изменять свой фенотип на фенотип других мезенхимальных линий. Во время процесса трансдифференцировки, проходящего с интенсивной пролиферацией, коммитированные клетки могут терять свой линейно-специфический фенотип и приобретать статус примитивной СК как по морфологии, так и по функции. Далее, под влиянием индукции эти дедифференцированные клетки могут приобрести новый дифференцировочный фенотип, т. е. подвергнуться редифференцировке. Авторы пришли к заключению, что как клетки-предшественники, так и полностью дифференцированные клетки сохраняют свою пластичность и мультипотенциал; и их пластичность может

вновь использоваться в условиях, соответствующих новому микроокружению, обеспечивая восстановление и регенерацию ткани. Эти данные согласуются с наблюдениями, сделанными более 30 лет назад, суть которых в том, что высоко дифференцированные хондроциты могут «трансдифференцироваться» в остеобласты [368]. Позднее было показано, что адипоциты также могут переключать свой фенотип на фенотип остеобластов [Bennett J. H., 1991]. Точное взаимоотношение между зрелыми и прогениторными клетками стромы КМ остается неясным и может иметь только небольшое сходство с взаимоотношениями ГСК и клеток крови.

Работы, проведенные на трансгенных и нокаутных мышах, представляют ценную информацию о том, как МСК дифференцируются во множество линий во время эмбрионального развития и гомеостаза у взрослых [642]. С одной стороны, анализ *in vitro* дифференцировки МСК в условиях, имитирующих этот процесс *in vivo*, приводит к выявлению различных факторов, регулирующих судьбу СК. Среди них секреторные молекулы и их рецепторы (например, TFG- β), молекулы экстраклеточного матрикса (например, коллагены и протеогликаны), цитоскелет актина и внутриклеточные факторы транскрипции (например, Cbfa 1/Runx2, PPAR γ , Sox9 MEF2). Все они играют важную роль в конверсии мультипотентных СК в специфические линии и в сохранении их фенотипов дифференцировки [294, 490, 559, Waddington R. I., et al., 2003]. Например, остеогенез МСК, как *in vitro*, так и *in vivo*, представляет хорошо отлаженную последовательность событий, включающую множество этапов и экспрессию различных регуляторных факторов. Во время остеогенеза мультипотентные МСК подвергаются асимметричному делению и образуют остеопредшественников, которые затем превращаются в остеопрогениторы, преостеобласты, функционирующие остеобласты и, в конце концов, остециты [701]. Это развитие от одной стадии конверсии к следующей сопровождается активацией и последующей инактивацией факторов транскрипции, в частности, Cbfa 1/Runx2, Msx2, Dlx5, Osx, и экспрессией генов маркеров, связанных с костью, в частности, остеопонтина, коллагена типа I, ЦФ, сиалопротеина кости и остеокальцина [294, Madras N., et al., 2002]. Нарушение последовательной экспрессии этих генов приведет к задержке развития клеток с фенотипом остеобластов и последующей неспособностью к образованию функционирующих остеобластов.

Хотя известны уже индуктивные факторы, вызывающие развитие клеток в направлении отдельных линий: кости [350], хряща [Johnstone B., et al., 1998], жира [593], мышц [775], молекулярные механизмы, осуществляющие регуляцию пути каждой линии, продолжают оставаться объектом интенсивных исследований. В настоящее время ясно, что МСК конститутивно секретируют специфические факторы роста и цитокины [307] и что индукция дифференцировки-конверсии в любом направлении сопровождается изменением синтеза этих секретируемых молекул и регуляции других белков, зависимыми от специфичности линии и стадии дифференцировки [349]. При этом важно, что каждый полученный препарат МСК имеет специфические для донора уровни конститутивно секретируемых цитокинов [307]. Это наблюдение позволило Caplan и Bruder [137] ввести представление о персонифицированной биологической точке отсчета («set point») — наличия биоактивного фактора гомеостаза, который контролирует изменения этого показателя при различных состояниях здоровья и патологии. Предполагается, что генотип каждого индивидуума контролирует секрецию и реакцию на цитокины и ростовые факторы, производимые МСК или другими клетками в культуре и, вероятно, *in vivo*.

2.4.5. Пероциты

Dennis и Charbord [188] на основании изучения экспрессии маркеров на клетках стромы КМ человека пришли к заключению, что развитие этих клеток осуществляется по пути дифференцировки, свойственному гладкомышечным клеткам сосудов (ГМКС). В культурах клеток стромы человека, происходящих из изолированных колоний, или из клеток, отобранных по яркому окрашиванию моноклональным антителом Stro-1 (Stro-1⁺), самыми ранними маркерами были α -ГМА и изоформа фибронектина, специфическая для ГМКС. Цитоскелетные маркеры, которые появлялись позднее (метавинкулин, h-кальдесмон и др.), а также белки экстраклеточного

матрикса (тромбоспондин-1, изоформа ламинина и др.), были те же, что обнаруживались на молодых ГМКС. По данным этих исследователей, дифференцировка клеток стромы в культуре полностью повторяет программу дифференцировки ГМКС. В настоящее время предполагают, что ГМКС имеют эндотелиальное происхождение или ГМКС и эндотелиальные клетки происходят из общей исходной клетки [817].

Эндотелиальные клетки и их предшественники могут менять свой эндотелиальный фенотип, характеризующийся экспрессией фактора Виллебранда, на фенотип ГМКС под влиянием TGF- β или при истощении ангиогенных факторов [188]. ЭСК человека, экспрессирующие рецепторы сосудистого эндотелиального фактора роста 1 (VEGF), были способны дифференцироваться в эндотелиальные клетки под влиянием VEGF и в ГМКС — под влиянием PDGF [817]. В мобилизации и дифференцировке ГМКС принимают участие несколько медиаторов, экспрессируемых и/или секретлируемых эндотелиальными клетками. Мобилизация ГМКС происходит, по всей вероятности, под влиянием взаимодействия PDGF, тканевого фактора, эндоглина и пока неизвестных белков, образующихся при индукции некоторых факторов транскрипции [Li Diy & Sorensen L. K., 1999]. Дифференцировка ГМКС регулируется, по-видимому, взаимодействием между TGF- β , инсулиноподобным фактором роста, эндотелином 1, ангиотензином 2, гепарансульфатом, ламинином, коллагеном IV и молекулами ретиноидов и ингибиторов, такими как PDGF, γ -интерферон и фибронектин. Кроме того, важную роль в дифференцировке ГМКС имеет форма клетки. В ответ на прикрепление и вытягивание экстраклеточного матрикса мезенхимальные клетки экспрессируют α -ГМА и другие цитоскелетные белки ГМКС через посредничество еще неизвестного механизма, включающего митогеном активированный белок киназы (МАРК) [188].

Может показаться, что в кроветворной строме КМ направление дифференцировки ГМКС не связано с известными функциями клеток стромы. Но при проведении анализа такая связь все же обнаруживается. Клетки стромы, включающиеся в поддержку кроветворения, синтезируют много цитокинов и молекул адгезии. Они также, вероятно, содействуют продвижению кроветворных клеток, так как могут изменять плотность эндотелиальных соединений и экспрессируют α -хемокин стромальный фактор 1 (SDF-1), усиливающий спонтанную миграцию CD34⁺CD38⁻клеток через эндотелиальный барьер [512]. Эта двойственная функция ГМКС в строме КМ — осуществление синтеза медиаторов и регуляция движения кроветворных клеток — напоминает две известные функции ГМКС, связанные со способностью этих клеток изменять характер своего фенотипа от синтетического до сократительного. Синтетический фенотип присущ незрелым или «дедифференцированным» клеткам, тогда как сократительный фенотип характерен для полностью зрелых клеток. Фенотипическое и функциональное сходство клеток стромы КМ и ГМКС позволило предположить, что обе эти популяции происходят из одной и той же популяции СК, локализующейся в КМ [188]. Эта гипотеза поддерживается наблюдением, что циркулирующие мезенхимальные клетки — предшественники могут обеспечить образование клеток со свойствами ГМКС, остеогенных клеток и адипоцитов [414, 416].

Экспрессия α -ГМА часто выявляется в неклонированных и в некоторых клонированных культурах клеток стромы КМ, в которых ее связывают с фазой активного роста клеток или дифференцировкой в гладкие мышечные клетки. Однако характер экспрессии α -ГМА в культуре клеток стромы КМ больше напоминает экспрессию этого маркера в перицитах и субинтимальных клетках, чем в клетках гладких мышц [260].

Ангиогенез во всех тканях сопровождается сопутствующим ростом эндотелиальных клеток и перицитов. Возникающие эндотелиальные трубки образуют EGF и PDGF- β . Эти ростовые факторы стимулируют рост и миграцию перицитов из субинтимального слоя ГМКС, а также вызывают пролиферацию клеток стромы КМ. Благодаря рецепторам PDGF- β , образуемым эндотелиальными клетками, и экспрессии таких же рецепторов на перицитах, последние оказываются в тесной связи с возникающей сетью сосудов [310]. Обратив внимание на взаимосвязь с васкулатурой, экспрессию одинаковых маркеров и сходство клеточной реакции на факторы роста, Bianco и др. [92] предположили, что перициты и ранние клетки стромы КМ являются

одним сообществом клеток. Перициты — один из самых неуловимых клеточных типов организма, и их возможная роль в качестве прогениторных клеток неоднократно предполагалась. Приводились экспериментальные доказательства их способности к образованию *in vivo* хряща и кости [197]. Сообщали, в частности, что перициты сетчатки могут образовать *in vitro* хрящ и кость [204]. Но в то время еще не догадывались о происхождении этого неуловимого типа клеток. На основании современных данных предполагается наличие во время роста и развития нескольких источников перицитов (в том числе перицитов КМ). Некоторые перициты могут мобилизовываться из предсуществующих резидентных мезенхимальных клеток; другие — происходить из эндотелиальных клеток или их предшественников; третьи — образоваться во время ангиогенеза или васкулогенеза из предсуществующих перицитов путем их репликации или дифференцировки по ходу формирующегося сосудистого ложа. Таким образом, предполагается иерархия стромальных прогениторных клеток КМ [92]. Одни из этих клеток могут иметь остеогенные маркеры, а другие — эндотелиальные/перицитарные маркеры.

К сожалению, выделение региональных стволовых клеток в достаточном количестве и с высокой чистотой остается трудной задачей. До сих пор не идентифицированы характерные маркеры, которые могли бы позволить провести положительную селекцию всех региональных СК. Обычно СК определяются по отсутствию экспрессии большинства тканеспецифических антигенов (Lin). Региональные СК не могут быть обнаружены по специфической локализации внутри организма (в нише), потому что они распределены с неодинаковой частотой и с разной степенью активности, в зависимости от возраста и локализации.

В отличие от ЭСК, региональные СК имеют меньшую способность к самообновлению, что в какой-то мере связано с более низкими уровнями теломеразы. Кроме того, у региональных СК более узок ряд дифференцированных клеточных линий, а их дочерние клетки прежде всего развиваются в клетки ткани своего происхождения, но не в другие клеточные типы. На основании ряда работ было сделано заключение, что региональные СК из различных источников, не имеющие определенного тканевого фенотипа, могут дифференцироваться в клетки-предшественники других тканей при наличии соответствующих условий и, в частности, «достаточности повреждения». Под термином «достаточность повреждения» понимают соразмерность поражения, травмы или врожденной ошибки развития механизмов тканевой или органной регенерации. Внушающие оптимизм результаты опытов *in vitro* предполагают возможность терапевтического применения региональных СК.

Образование организованных тканей во время нормального эмбриогенеза контролируется многими индуктивными сигналами и комплексом эпителиально-мезенхимальных взаимодействий. Такие же сигналы и взаимодействия имеют место в окружении региональных СК, но из-за того, что еще не полностью изучены точные индуктивные элементы, часто нет возможности воспроизвести *in vitro* направление дифференцировки региональных СК.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко З. А. Стволовые кроветворные клетки и лейкоз. Киев: Наук. думка, 1978. — 179 с.
- Грищенко В. И., Петренко А. Ю., Волкова Н. А., Скоробогатова Н. Г. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток-предшественников из эмбриональной печени человека в условиях *in vitro* // Доповіді НАН України. — 2005. — № 2. — С. 138–141.
- Лурія Е. А., Чахатова О. В., Фриденштейн А. Я. Происхождение фибробластоподобных клеток в культуре костного мозга // Цитология. — 1966. — Т. 8, 1. — С. 115–119.
- Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г. и др. Стромальные клетки-предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при многослойном культивировании // Журнал АМН України. — 2008. — Т. 14, № 2. С. 354–365.
- Петренко А. Ю., Мазур С. П., Петренко Ю. А. и др. Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // Трансплантологія. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 218–220.

Петренко Ю. А. Иммунорегуляторные свойства клеток фетальной печени человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2007. — Т. 2, 3. — С. 57–61.

Скоробогатова Н. Г., Волкова Н. А., Петренко А. Ю. Остеогенные и адипогенные свойства фибробластоподобных клеток-предшественников фетальной печени человека // Цитология. — 2008. — Т. 50, № 4. — С. 317–322.

Фриденштейн А. Я., Деригласова Ю. Ф., Кулагина Н. Н. Клонирование клеток-предшественников фибробластов в монослойной культуре // Бюл. Эксперим. Биол. Мед. — 1973. — Т. 75, 10. — С. 90–94.

Фриденштейн А. Я., Петракова К. В., Киралесова А. И., Фролова Г. И. Предшественники костной и гемопоэтической тканей. Анализ гетеротопических трансплантаций костного мозга // Цитология. — 1968. — Т. 10, 5. — С. 557–567.

Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Герасимов Ю. В. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал скелетных костномозговых колониеформирующих клеток // Цитология. — 1986. — Т. 28, 3. — С. 341–349.

Чертков И. Л., Воробьев А. И. Современная схема кроветворения // Пробл. гематол и перелив. крови. — 1973. — Т. 18, № 10, С. 3–13.

Alison M. R., Poulson R., Jeffery R., et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells // Nature. — 2000. — Vol. 406. — P. 257.

Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells // Nature. — 1963. — Vol. 197. — P. 452–454.

Bennett J. H., Joyner C. J., Triffitt J. T., et al. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential // J. Cell Sci. — 1991. — Vol. 99. — P. 131–139.

Bertoncello I., Bradley T. R., Hodgson G. S., Dunlop J. M. The resolution, enrichment, and organization of normal bone marrow high proliferative potential colony-forming cell subsets on the basis of rhodamine-123 fluorescence // Exp. Hematol. — 1991. — Vol. 19. — P. 174–178.

Born W., White J., Kappler J., et al. Rearrangement of IgH genes in normal thymocyte development // J. Immunol. — 1988. — Vol. 140. — P. 3228–3232.

Caplan A. I. Mesenchymal stem cells // J. Orthop. Res. — 1991. — Vol. 9, 5. — P. 641–650.

Falk A., Holmström N., Carlen M., et al. Gene delivery to adult neural stem cells // Exp. Cell Res. — 2002. — Vol. 279, 1. — P. 34–39.

Fode C., Gradwohl G., Morin X., et al. The bHLH protein neurogenin 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons // Neuron. — 1998. — Vol. 20. — P. 483–494.

Holyoake T. L., Freshney M. G., Konwalinka G., et al. Mixed colony formation in vitro by the heterogeneous compartment of multipotential progenitors in human bone marrow // Leukemia. — 1993. — Vol. 7. — P. 207–213.

Hows J. Adult stem cell therapy beyond haemopoietic stem cell transplantation? An update // Transplant. Immunology. — 2005. — Vol. 30. — P. 1–3.

Ip J. E., Wu Y., Huang J., et al. Mesenchymal Stem Cells Use Integrin $\beta 1$ Not CXC Chemokine Receptor 4 for Myocardial Migration and Engraftment // Mol. Biol. Cell. — 2007. — Vol. 18, № 8. — P. 2873–2882.

Johnstone B., Hering T. M., Caplan A. I., et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells // Exp. Cell Res. — 1998. — Vol. 238. — P. 265–272.

Korinek V., Barker N., Moerer P., et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. // Nat. Genet. — 1998. — Vol. 19. — P. 379–383.

Lemieux M. E., Evans C. J. Identification of properties that can distinguish primitive populations of stromal-cell-responsive lympho-myeloid cells from cells that are stromal-cell-responsive but lymphoid-restricted and cells that have lympho-myeloid potential but are also capable of competitively repopulating myeloablated recipients // Blood. — 1996. — 88. — P. 1639–1648.

Li D., Sorensen L. K. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin // Science. — 1999. — Vol. 248. — P. 1534–1537.

Lucas P.A., Calcutt A.F., Southerland S.S., et al. A population of cells resident within embryonic and newborn rat skeletal muscle is capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes // Wound Repair Regen. — 1995. — Vol. 3, N4. — P. 449 — 460.

Madras N., Gibbs A.L., Zhou Y., et al. Modeling stem cell development by retrospective analysis of gene expression profiles in single progenitor derived colonies // Stem Cells. — 2002. — Vol. 20. — P. 230–240.

Manca M.F., Zwart I., Beo J., Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood // Cytotherapy. — 2008. — Vol. 10, 1. — P. 54–68.

Nicolini F.E., Holyoake T.L., Cashman J.D., et al. Unique differentiation programs of human fetal liver stem cells shown both in vitro and in vivo in NOD/SCID mice // Blood. — 1999. — 94. — P. 2686–2695.

Petzer A.L., Hogge D.E., Landsdorph P.M., et al. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term culture-initiating cells) in vitro and their expression in defined medium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA — 1996. — Vol. 93. — P. 1470–1474.

Punzel M., Wissink S.D., Miller J.S., et al. The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. // Blood. — 1999. — Vol. 93. — P. 3750–3756.

Rao M.S. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system // Anat. Rec. — 1999. — Vol. 257. — P. 137–148.

Surbek D.V., Steinmann C., Burk M., et al. Developmental changes in adhesion molecule expressions in umbilical cord blood CD34+ hematopoietic progenic progenitor and stem cells // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2000. — Vol. 183. — P. 1152–1157.

Szilvassy S.J., Fraser C.C., Eaves C.J., et al. Retrovirus-mediated gene transfer to purified hematopoietic stem cells with long-term lympho-myelopoietic repopulating ability // Proc. Natl. Acad. Sci. USA — 1989. — Vol. 86: — P. 8798–8802.

Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat. Res. — 1961. — Vol. 14. — P. 213–222.

Tremain N., Korkko J., Ibberson D., et al. MicroSAGE analysis of 2353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mPNAs of multiple cell lineages // Stem Cells. — 2001. — Vol. 19. — P. 408–418.

Waddington R.J., Roberts H.C., Sugars R.V., et al. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation // Eur. Cell Mater. — 2003. — Vol. 6. — P. 12–21.

Yang A., McKeon F. P6 3 and P7 3: P5 3 mimics, menaces and more // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. — 2000. — Vol. 1. — P. 199–207.

Zhang Z.Y., Teoh S.H., Chong M.S., et al. Superior Osteogenic Capacity for Bone Tissue Engineering of Fetal Compared To Perinatal and Adult Mesenchymal Stem Cells. // Stem Cells. — 2009. — Vol. 27, 1. — P. 126–37.

ГЛАВА 3. РОЛЬ ТЕЛОМЕРОВ В БИОЛОГИИ СТЕВОЛОВОЙ КЛЕТКИ

3.1. Организация и функция теломер

Теломеры, или концевые образования линейных хромосом,—важные генетические элементы, контролирующие число возможных делений нормальных соматических клеток человека. Они состоят из тандемных повторов специфической ДНК и связанных с ними белков. Шапочки теломер прикрывают концы хромосом, предотвращая их слипание и проявление генетической нестабильности. В первичных соматических клетках, таких как фибробласты или прогениторные клетки кроветворной системы, потеря теломер ДНК происходит при каждом цикле деления клетки, а также может быть вызвана другими причинами, приводящими к окислительному повреждению ДНК. Для восстановления этой потери теломерная ДНК может удлиняться с помощью фермента теломеразы — РНК-зависимой ДНК-полимеразы, которая действует подобно обратной транскриптазе: использует одноцепочечную РНК-матрицу для синтеза второй цепи и восстановления концов хромосом (рис. 3.1). Активность теломеразы постоянно обнаруживается в печени плодов мышей и в ГСК КМ [836].

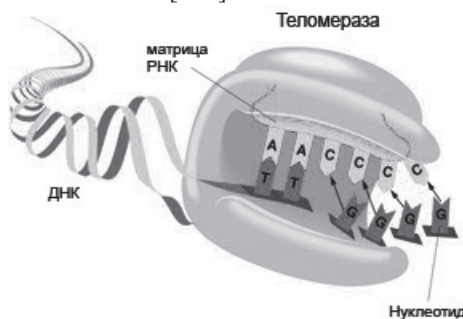


Рис. 3.1. Удлинение теломерной ДНК с помощью теломеразы

Теломераза использует одноцепочечную РНК-матрицу для синтеза второй цепи и восстановления концов хромосом (рисунок с сайта www.bio.miami.edu).

В большей части клеток крови содержание теломеразы ограничено, и активность ее строго контролируется. Выявлено, например, укорочение теломер в лейкоцитах с возрастом, после трансплантации *in vivo* и при культивировании *in vitro*. Постепенное укорочение теломер приводит в конце концов к нарушению функции хромосом и апоптозу клетки. При дифференцировке активность теломеразы в популяциях мультипотентных предшественников перестает обнаруживаться, но исследование ГСК человека ($CD34^+$, $CD45Ra^{lo}$, $CD71^{lo}$) показало, что теломеразная активность может индуцироваться в циклах деления этих клеток [цитир. 11].

Клетки зародышевых линий, такие как спермии, клетки семенников и яичников, имеют теломеры длиной до 10–20 kb, которые не укорачиваются при старении организма [53]. РНК теломер клеток зародышевой линии содержит видеоспецифическую матрицу для синтеза теломерных повторов. У дрожжей, мышей и человека получены клоны таких РНК. У нескольких видов, включая человека, клонированы также гены, кодирующие каталитическую субъединицу теломеразы. Теломеразная активность легко определяется в семенниках и яичниках человека и повышена в легких, печени, молочной железе, нейробластоме, карциноме яичника и злокачественных опухолях кроветворной системы [836]. Эти данные предполагают, что с теломеразой могут быть связаны как злокачественные трансформации, так и клеточное бессмертие.

У всех позвоночных теломеры состоят из тандемных повторов нуклеотидов (TTGGGG / CCCCCA) $_n$ и связанных с ними белков. Длина повторов варьирует у разных видов. У человека длина повторов теломер колеблется от 2-х до 15 тысяч пар оснований, в зависимости от типа ткани, возраста индивида и репликативного прошлого клеток. Теломеры отдельных хромосом также отличаются по величине, в зависимости от длины самой хромосомы. У хромосомы 17р обычно определяется наименьшая длина повторов теломер. Теломеры предупреждают ого-

ление концов хромосом в местах разрывов ДНК и защищают их от деградации и склеивания. Теломеры играют также роль в процессе мейоза и во внутриядерной организации хромосом.

3.2. Потеря теломеров и ее значение

Более 40 лет назад Хейфлик (Hayflick) на основании длительного изучения нормальных диплоидных фибробластов пришел к выводу, что жизнь большинства человеческих клеток не может быть бесконечной, поскольку она запрограммирована на ограниченное число клеточных делений [36, 305]. В 1990 году появился ряд работ, выявивших потерю теломеров при репликациях и с возрастом. Авторы этих работ предположили, что гипотеза Хейфлика может быть связана с постепенным возрастным укорочением теломеров [297]. В последующих работах действительно было показано, что перенос гена теломеразы предупреждает эрозию теломеров и способствует бессмертию клеток [106]. С тех пор появилось много сообщений в поддержку представления, что укорочение теломеров ограничивает число делений, на которое способно большинство нормальных диплоидных клеток. Постепенно пришли к заключению, что укорочение теломеров развивается у долгоживущих млекопитающих как защитный механизм, контролирующий неограниченную и опасную для жизни особи пролиферацию органоспецифических СК и лимфоцитов [423].

ДНК находится под постоянным воздействием факторов окружающей среды и побочных продуктов нормального обмена, таких как реактивные производные кислорода. Для обеспечения точных копий генетической информации, предназначенной последующим поколениям, весь механизм клеточного цикла обеспечивается комплектом точек наблюдения, названных «контрольными точками клеточного цикла» [423]. Общая функция этих контрольных точек заключается в определении поврежденной или аномально структурированной ДНК. Вскоре установили, что контрольные точки повреждения ДНК, помимо замедления клеточного цикла, контролируют восстановление ДНК и процессы репликации. По сравнению с одноклеточными организмами многоклеточным организмам необходима не только более высокая точность репликации и реставрации ДНК, но также более высокое разнообразие реакций на повреждение ДНК. Если, например, реакция дрожжей может быть описана как двойственная между делением и задержкой деления, реакция млекопитающих более сложная и включает такие исходы, как старение и апоптоз. Более сложные реакции многоклеточных организмов стали возможны благодаря новым регуляторным контрольным модулям, которые отсутствуют у дрожжей и которые не действуют у млекопитающих с короткой продолжительностью жизни, таких как грызуны. Эти дополнительные контрольные модули связаны с длиной и функцией теломеров.

3.3. Механизмы потери теломеров

В клетках человека потеря теломерной ДНК может происходить вследствие нескольких механизмов, связанных с репликацией ДНК, ее ремоделированием и восстановлением. Возможность укорочения теломеров в результате окислительного повреждения стала известна только недавно. Установлено, что теломерная ДНК в 5–10 раз более чувствительна к окислительному повреждению, чем нетеломерная геномная ДНК [312, 553]. Зависимость укорачивания теломеров от окислительных повреждений и значение окислительно-восстановительного потенциала клеток для предупреждения такого повреждения еще предстоит изучить.

Механизм, посредством которого короткие теломеры сигнализируют ДНК о повреждении, также изучен недостаточно [311]. Предполагают, что в генерации таких сигналов участвуют 3'-конец хромосом, АТМ и ген *p53* [423]. Другой важный вопрос: на каком этапе клеточного цикла происходит подача сигнала? Репликация ДНК обязательно включает в себя процесс ремоделирования структуры теломеров. Так как известно, что во время репликации ДНК происходит некоторая потеря теломеров, предполагают, что неспособность образовать функциональные теломеры после репликации инициирует сигнал о повреждении ДНК во время S- или G2-фазы клеточного цикла. Однако, когда диплоидные фибробласты человека достигают ре-

пликативного старения, необратимая задержка роста у них обычно происходит в фазе G1. Существует мнение, что теломеры постоянно «включены» или «выключены», даже когда клетки находятся в фазе G0/G1, с вероятностью того, что состояние «включены» обратно и непрямо коррелирует с длиной теломерных повторов [423]. В соответствии с этими представлениями сила сигнала о повреждении ДНК, производимого теломерами, будет постепенно возрастать по мере общего укорочения теломеров. Такая модель согласуется с антиапоптозным эффектом длинных теломеров, экспрессией теломеразы и повышением уровня супрессорного гена *p53* (с увеличенной чувствительностью к апоптозу) в стареющих клетках. Отмечено, что у разных индивидуумов длина теломеров, необходимая для активации сигнальных процессов, различается, что препятствует попыткам использовать длину теломеров как абсолютный показатель клеточных реакций [672].

3.4. Теломераза и ее роль в биологии

Для компенсации потери повторов теломеров клеткам необходима функционирующая теломераза. Теломераза — рибонуклеопротеин, содержащий в качестве обязательных компонентов белок РНК-зависимой ДНК-полимеразы-теломеразы (hTERT) и теломеразную РНК матрицу (hTR). Кроме того, описано еще много других белков, которые имеют значение для сборки теломеразы, ее ядерной локализации и стабильности. Теломераза обладает способностью наращивать 3'-концы теломеров. Самые высокие уровни теломеразы отмечены в бессмертных клетках, содержащих теломеры постоянной длины, таких как стволовые плюрипотентные клетки (ЭСК и ЭЗК). В ЭСК человека высокие уровни теломеразной активности обнаруживаются даже после культивирования *in vitro* в течение более одного года (свыше 300 популяционных делений) [58, 59, 548]. Примечательно, что стволовые мультипотентные клетки, в частности МСК, также экспрессируют теломеразу в количестве, достаточном для поддержания постоянной длины теломеров [631]. ГСК *in vivo* конститутивно экспрессируют теломеразу, проявляя уникальное для соматических клеток свойство. Однако в условиях культивирования активность теломеразы не сохраняется. К тому же, по причинам, которые пока неизвестны, в ГСК содержание теломеразы недостаточно для сохранения длины теломеров [423]. Между тем установлено, что уровни теломеразы в этих клетках тонко регулируются и имеют важное физиологическое значение. Роль так называемых альтернативных путей [315] в удлинении и/или сохранении длины теломеров в кроветворных клетках неясна. Вероятно, эти механизмы неэффективны в клетках, экспрессирующих теломеразу. Из-за того, что удлинение теломеров в кроветворных клетках через участие теломеразы и/или альтернативных путей ограничено, молекулярные дефекты, вызывающие ускоренное укорочение теломеров, могут привести к развитию патологии кроветворной системы, в частности, апластической анемии [279]. Во многих случаях бывает невозможно различить прямые или не прямые причины укорочения теломеров. При дискератозе причина, вероятно, прямо связана с недостаточностью теломеразы; тогда как при анемии Фанкони, например, укорочение теломеров может быть обусловлено как прямой причиной — дефектной репарацией ДНК теломеров, так и не прямой — дефектами прогениторных клеток, которые сопровождаются повышенной компенсаторной пролиферацией оставшихся ГСК [279].

Вслед за потерей повторов теломеров возникает сигнал о повреждении ДНК, сигнализирующий о задержке клеточного цикла, который осуществляется, вероятно, через повышение уровня *p53* [423]. Если после этого наблюдается восстановление длины оставшихся теломеров, происходящее с участием теломеразы и/или рекомбинации, задержка клеточного цикла будет временная. Но при длительной потере теломерной ДНК постепенно образуется слишком много коротких теломеров с ограниченной способностью к восстановлению своей длины. В этом случае клеткам, нормальным во всех других отношениях, предназначено погибнуть вследствие апоптоза или перехода в безответное состояние («репликационное старение»), зависящее от реакции отдельных типов клеток на высокие и устойчивые уровни *p53*. Большинство диплоидных соматических клеток не экспрессирует высоких уровней теломеразы и вступает в репликацион-

ное старение после окончания времени пролиферативной жизни в тканевой культуре — обычно после 50–80 популяционных делений [314]. Предполагают, что репликационный период жизни клеток у долгоживущих видов находится под особым контролем. Этот контроль, с одной стороны, должен обеспечить достаточное число делений клеток с целью сохранения их функций на все время нормальной продолжительности жизни. С другой стороны, он, действуя как тормозящий механизм, должен предупредить чрезмерную клеточную пролиферацию и развитие опухоли [423]. У большинства кроветворных клеток человека необходимый баланс поддерживается регуляцией активности теломеразы на уровне, достаточном для обеспечения минимальной длины теломеров при соотношении 92 теломера на клетку [423]. Низкие уровни активности теломеразы и развивающееся в итоге укорочение теломеров может способствовать старению организма вследствие двух причин. Во-первых, из-за увеличения у пожилых лиц количества клеток, достигших конца их запрограммированной пролиферативной продолжительности жизни. Как следствие, у таких лиц могут быть скомпрометированы реакции Т-лимфоцитов. Во-вторых, экспрессия генов в клетках при старении может быть необычной, приводящей к aberrантной секреции некоторых молекул, в том числе энзимов и цитокинов. Таким образом, оба фактора могут вызывать нарушение иммунных реакций у людей старшего возраста.

Способность индуцировать или повышать активность теломеразы может иметь большое значение для сохранения репликативного потенциала нормальных СК, находящихся в самообновляющихся тканях, таких как ткани кроветворной системы [150, 320]. Клетки-предшественники ГСК из КМ взрослого человека экспрессируют низкие уровни теломеразы, которые повышаются при пролиферации и/или дифференцировке. Значительная активность теломеразы обнаруживалась в очищенной фракции культивируемых CD34⁺, CD71⁺ клеток, причем она возрастала синхронно с повышением экспрессии CD45RA и CD71. Клетки печени плода человека с фенотипом CD34⁺ CD38⁻ также экспрессируют легко определяемые уровни теломеразы [813]. Предполагают, что экспрессия теломеразы регулируется различно в кроветворных клетках мыши и человека. Теломераза в культивированных кроветворных клетках человека влияет преимущественно на короткие теломеры для сохранения минимального числа повторов [426]. Вследствие этого, теломераза позволяет продлить репликативную продолжительность жизни ГСК.

3.5. Регуляторная роль теломеров в биологии соматических клеток

Давно известно, что при культивировании *in vitro* клеток человека происходит укорочение их теломеров [169]. У более старших доноров теломеры в клетках разных тканей короче, чем у молодых лиц [297]. После внедрения в лабораторную практику метода количественной флуоресценции на основе гибридизации *in situ* (FISH) и методики проточной цитометрии, позволяющей измерять длину теломеров в клетках суспензионных культур (flow FISH), установили, что возрастное уменьшение длины теломеров в лимфоцитах выражено более четко, чем в гранулоцитах, и что быстрое укорочение теломеров в ранний период жизни сопровождается затем медленным снижением до 50–60 лет, после которых этот процесс снова ускоряется [423]. Длина теломеров в гранулоцитах может быть использована в качестве искусственного маркера длины теломеров в ГСК. Такой подход был применен, в частности, для моделирования оборота ГСК у человека [220]. Однако длина теломеров у человека в любом возрасте варьирует в очень широких пределах [422, 653], что обусловлено, в основном, индивидуальными генетическими особенностями. У 70-летних монозиготных близнецов, например, отмечалась очень сходная длина теломеров как в гранулоцитах, так и в лимфоцитах, тогда как у дизиготных близнецов длина теломеров различается, хотя и не так выражено, как у неродственных лиц [697].

Предполагают, что общая продукция кроветворных клеток из одной ГСК определяется главным образом дифференцировкой стволовых и прогениторных клеток, а не репликационным старением. Более того, случайная потеря отдельных СК из-за укорочения теломеров, вероятно, не будет влиять на общий гемопоэз (или длину теломеров в гранулоцитах) вследствие наличия других ГСК [423]. Богатый опыт применения аллогенных и аутологичных трансплантаций

кроветворных клеток также свидетельствует о широком репликационном потенциале нормальных ГСК. Наряду с этим, в ГСК существуют и функционируют контрольные точки теломеров. Это подтверждается возрастным снижением длины теломеров в гранулоцитах, умеренной потерей теломеров после аллогенной трансплантации [652] и частым развитием апластической анемии при недостаточности теломеразы [423].

На стимуляцию цитокинами *in vitro* ГСК человека реагируют повышением активности теломеразы [150, 320]. Но так как во время устойчивого гемопоэза большая часть СК продолжает оставаться в покое [426], механизм появления экспрессии теломеразы в циклирующих ГСК пока остается необъяснимым [675]. Между тем это важная проблема, так как самообновление и репликативный потенциал большинства примитивных кроветворных клеток может зависеть от теломеразы, сохраняющей стабильные теломеры [425].

Не все клетки в кроветворной системе запрограммированы на функционирование контрольных точек теломеров. Особенно интересным исключением являются В-лимфоциты, у которых длина теломеров с возрастом значительно варьирует. Не вызывает сомнений, что В-лимфоциты экспрессируют достаточно теломеразы (и, возможно, других факторов) для эффективного удлинения теломеров. Может быть, необходимо много клеточных делений или «созревание аффинитета» антител для включения контрольной точки теломеров. Предполагают, что с нарушением функции контрольных точек может быть связан более высокий риск развития опухолей В-лимфоцитов. Поэтому в человеческой популяции отмечается более высокая частота В-лейкозов по сравнению с Т-лейкозами [423].

Таким образом, на основании исследований, проведенных в разных областях биологии, можно сделать заключение, что теломеры являются важными регуляторными элементами, контролирующими количество делений нормальных соматических клеток человека. Реакция на повреждение ДНК, запускаемая активацией контрольных точек теломеров, может завершиться удлинением теломеров с помощью теломеразы и/или рекомбинации. Но у большей части соматических клеток, включая ГСК, способность к такому восстановлению длины теломеров оказывается сниженной; и короткие теломеры ограничивают пролиферативный потенциал этих клеток. Возможно, что контрольные точки теломеров развиваются у долгоживущих видов как механизм подавления опухолей [423]. Функционирование контрольных точек теломеров может помочь объяснить нераскрытые аспекты биологии СК, в частности, «истощение» СК при апластической анемии и других пролиферативных нарушениях. В то же время поведение клеток, экспрессирующих высокий уровень теломеразы или утрачивающих функцию *p53* и тем самым инактивирующих постсигнальные события, может порой не соответствовать функции контрольных точек теломеров. В некоторых клетках, таких как подтипы В-лимфоцитов, контрольные точки теломеров могут не проявлять себя, а высокий уровень теломеразы может способствовать развитию опухолей у этих клеток. Такое относительно редкое событие, как потеря функции *p53*, способно привести к хромосомным слияниям и разрывам и вызвать злокачественное перерождение, что иногда проявляется при хроническом миелоидном лейкозе.

Механизмы, с помощью которых стволовые плюри- и мультипотентные клетки приобретают широкий потенциал развития или остаются недифференцированными, в полной мере не изучены. Современные данные позволяют предполагать вовлечение теломеразы в развитие клеточного бессмертия и злокачественного перерождения. Хотя действие регуляторных модулей, связанных с длиной и функцией теломеров, предполагается только у долгоживущих видов, теломеразная РНК-матрица для синтеза повторов теломеров была клонирована у ресничных, дрожжей и у грызунов. У нескольких видов, в том числе человека, клонированы гены, кодирующие обратную транскриптазу — каталитическую единицу теломеразы. Но состояние экспрессии теломеразы у циркулирующих СК (например, ГСК) не изучено пока в полной мере. Большинство ГСК при устойчивом состоянии гемопоэза остаются в покое, что предполагает действие механизма, репрессирующего активность теломеразы.

ГЛАВА 4. РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПУТИ РАЗВИТИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В последние годы, наряду с увеличением числа публикаций по СК, возрастает интерес к механизмам, определяющим развитие и дифференцировку этих клеток. Понимание этих механизмов требует изучения внешних и внутренних факторов, поддерживающих длительное сохранение СК в недифференцированном состоянии и обеспечивающих их последующую дифференцировку СК на протяжении всех стадий развития.

4.1. Внешние факторы, влияющие на свойства стволовых клеток

4.1.1. LIF (leukemia inhibitory factor)

LIF (лейкемию ингибирующий фактор) — один из цитокинов, необходимых для поддержания мультipotентности генома у пролиферирующих незрелых клеток некоторых видов. Он относится к семейству цитокинов типа IL-6. Эти цитокины стимулируют клетки через рецепторы gp130, но, как гетеродимеры, могут также связываться со специфическими рецепторами LIF (LIF-R). Связывание LIF с gp130 приводит к активации тирозин-киназы и белков STAT (сигнальной трансдукции и активаторов транскрипции), их транслокации (перемещению) в ядро, связыванию с ДНК и последующей активации транскрипции. Было показано, что способность LIF к подавлению дифференцировки СК мыши обусловлено активацией этим цитокином белков STAT3. В отсутствие LIF пролиферацию СК мыши можно поддержать, активируя STAT3 каким-либо другим способом [486]. Но, хотя один LIF может при наличии ФТС в культуральной среде предотвратить дифференцировку СК мыши, после удаления сыворотки он уже не может препятствовать дифференцировке этих клеток, например, в нейральные клетки [178]. Вероятно, это обусловлено наличием в сыворотке каких-то еще неизвестных факторов, которые поддерживают LIF в его действии на дифференцировку СК мыши.

На СК человека LIF не влияет. Это свойство скорее всего связано с тем, что активация STAT3 в клетках человека не предотвращает дифференцировки СК человека. В то время как в недифференцированных СК мыши выявляют высокий уровень фосфорилированных белков STAT3, в недифференцированных клетках человека таких активированных форм этих белков не обнаруживают [332].

4.1.2. bFGF (basic fibroblast growth factor)

bFGF (щелочной фактор роста фибробластов) — универсальный стимулятор клеток-предшественников в клоне СК. Этот фактор необходим для длительного культивирования СК человека в недифференцированной форме при наличии в среде ФТС или заменителя сыворотки. Кроме того, bFGF повышает эффективность клонирования клеток [58]. В бессывороточной среде, не содержащей bFGF, клетки подвергаются дифференцировке. bFGF имеет большое значение для размножения любых плюрипотентных клеток человека. Этот фактор, в частности, необходим для того, чтобы из временно пролиферирующей популяции примордиальных (первичных) зародышевых клеток получить неопределенно долго живущую популяцию ЭЗК. Но одного bFGF все же явно недостаточно, чтобы надежно задержать дифференцировку СК [178].

Предполагают, что ФТС содержит много неизвестных факторов, которые способны предотвращать дифференцировку СК. При добавлении к бессывороточной среде BMP4 — морфогенетического белка, обычно вырабатываемого клетками мезенхимы, — эта культуральная среда становится способной поддержать жизнеспособность СК [824]. Но так как ни LIF, ни BMP4 не влияют на самообновление СК, поиски других факторов, которые могут заменить кондиционную среду, продолжаются. В последнее время обсуждается наличие путей самообновления СК, независимых от активации белков STAT3 [85]. По мнению одних исследователей, это может быть путь, связанный с генами Wnt [663]; другие — предполагают участие TGFβ1 в сочетании с некоторыми другими факторами [59]. Но ни одна из этих схем не была апробирована для рутинного выращивания СК человека.

4.2. Внутренние факторы, влияющие на свойства стволовых клеток

4.2.1. Фактор транскрипции Oct3/4

Oct3/4 — транскрипционный фактор, принадлежащий к семейству ДНК-взаимодействующих регуляторных белков с октамерной последовательностью, связывающихся с высококонсервативными элементами (POU-доменами), которые обнаруживаются в составе промоторов и энхансеров многих генов эукариотов. Одной из уникальных особенностей Oct3/4 является его экспрессия преимущественно в плюрипотентных клетках. Эмбрионы мышей с мутацией гена *Oct3/4* погибают сразу же после имплантации вследствие отсутствия ВМБ [537]. ЭСК мыши и человека, у которых вызывали снижение уровней Oct3/4, дифференцировались в клетки трофобласта, которые при всех других обстоятельствах из ЭСК как мыши, так и человека никогда не образуются. При повышении в два раза уровня экспрессии Oct3/4 в ЭСК мыши наблюдали дифференцировку этих клеток во внеэмбриональную эндодерму и мезодерму [540].

Гены и мишени, определяющие активность *Oct3/4*, включают *Fgf4*, транскрипционный кофактор Utf-1, белок *Rex-1*, α -рецептор TFG, остеопонтин, *Fdx15* и др. [84]. Каким образом активация генов-мишеней *Oct3/4* приводит к установлению и поддержанию плюрипотентности, пока не известно. Взаимодействуя с кофакторами, *Oct3/4* может выступать и как активатор, и как репрессор транскрипции. Наиболее известные кофакторы *Oct3/4* — аденовирус ELA, высокомолекулярный белок HMG-1, фактор Sox-2 [178]. В плюрипотентных клетках кофакторы *Oct3/4* представлены с различной степенью экспрессии.

4.2.2. Сигнальная система Hedgehog

Сигнальная система Hedgehog (HH) была впервые идентифицирована у дрозофил, которым она необходима в период раннего эмбрионального развития [449]. У млекопитающих выявлено 3 лиганда Hedgehog: Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) и Indian Hedgehog (Ihh), представляющие собой гликопротеины. Эти лиганды секретируются сигнальными клетками и связываются со своими трансмембранными рецепторами: Hedgehog-взаимодействующим белком 1 (Hh1) и Patched (Ptch) на клетках, реагирующих на сигналы HH. В отсутствие лигандов белок Ptch образует неактивный рецепторный комплекс с еще одним трансмембранным белком Smoothed (Smo) и блокирует его функцию. При появлении лигандов происходит разблокирование неактивных рецепторных комплексов, и Smo инициирует сигнальный каскад, который приводит к освобождению факторов транскрипции Gli1, Gli2 и Gli3. Белки Gli переносятся в ядро и контролируют транскрипцию генов-мишеней. В отсутствие лигандов белки Gli связываются с цитоскелетом, взаимодействуя с мультибелковым комплексом, включающим белки Fused (Fu) и Suppressor of Fused (SuFu) [576]. В неактивной ситуации SuFu предупреждают транслокацию (перенос) Gli в ядро; в активной ситуации Fu подавляет SuFu, в результате чего происходит освобождение Gli (рис. 4.1).

Белки Gli регулируют транскрипцию нескольких генов, в том числе генов, контролирующих пролиферацию, таких как *циклин D*, *циклин E*, *Мус*, компоненты EGF и путей ангиогенеза, включая PDGF и VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста). В постэмбриональном периоде гены HH контролируют общее количество СК в эпителии и КМ. У трансгенных зародышей мышей с двойной дозой *Shh* в нервной трубке число клеток-предшественников в клонках НСК спинного мозга увеличено в 2–3 раза [Rowitch, et al., цит. обзор 25]. В последнее время, например, было показано, что сигналы HH важны для эмбриональной индукции грудной железы, морфогенеза ее протоков и развития альвеол. Добавление в культуру эпителия грудной железы рекомбинантного *Shh* стимулировало образование маммосфер и приводило к увеличению их размеров. Процесс могли блокировать циклопамином — ингибитором Smo [313]. Эти данные подтверждают, что сигнал HH участвует в самообновлении СК грудной железы.

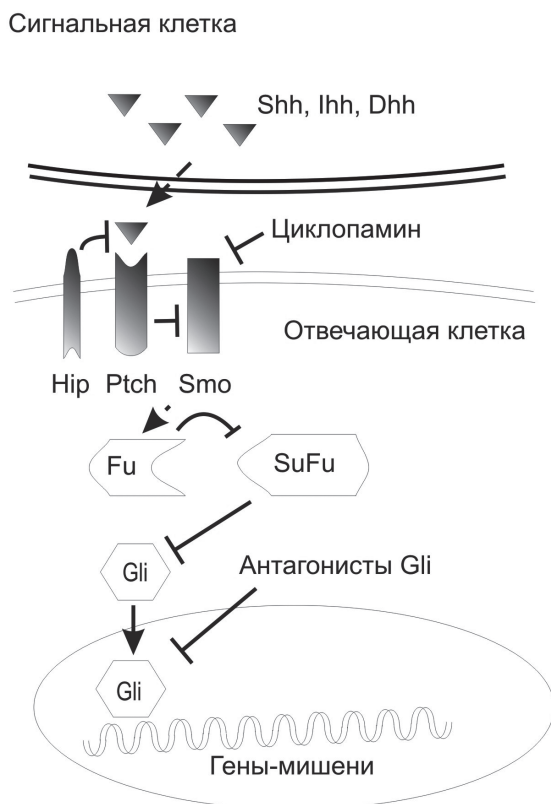


Рис. 4.1. Схематическая диаграмма сигнального пути Hedgehog

Лиганды секретируются сигнальными клетками системы НН и связываются рецепторами Ptch клеток, реагирующих на сигнал НН. В отсутствие лигандов Ptch связывается с Smo и блокирует его функцию. При наличии лигандов подавление снимается, и Smo инициирует сигнальный каскад, под влиянием которого освобождаются транскрипционные факторы Gli из цитоплазматических белков Fu и SuFu. В неактивной ситуации SuFu предупреждает транслокацию Gli в ядро; в активной ситуации Fu подавляет SuFu, вследствие чего белки Gli освобождаются и после переноса в ядро контролируют транскрипцию генов-мишеней.

4.2.3. Сигнальная система Notch

Трансмембранные рецепторы Notch являются частью других сигнальных путей, имеющих решающее значение в регуляции судьбы клеток многих тканей [526]. У млекопитающих белки Notch представлены 4-мя гомологами (Notch 1 — Notch 4). Они экспрессированы во многих СК и ранних клетках — предшественниках. В нейрогенезе, например, участвуют Notch 1 и 2, причем в нейросферах эмбрионального мозга экспрессирован ген *Notch-1*, тогда как в нейросферах постнатального мозга экспрессирован ген *Notch-2* [25]. Белки Notch взаимодействуют с несколькими лигандами, связанными с поверхностью клеток: Delta, Delta-подобный, Jagged 1, Jagged 2 и др. Подобное взаимодействие регулируется, в свою очередь, рядом модификаторов, образующих целое семейство Fringe. При связывании с лигандами после серии расщеплений внутримембранных комплексов, в которых участвуют протеазы, происходит активация рецепторов Notch, сопровождающаяся транслокацией (переносом) домена Notch в ядро клетки, в котором этот домен вызывает снижение экспрессии гена-мишени. Активация пути Notch обеспечивает изменение судьбы клетки, включая самообновление СК или дифференцировку клеток-предшественников в определенном направлении (рис. 4.2). Например,

в эпидермисе кожи человека взаимодействия Delta-Notch-1 обеспечивали массивную экспансию прогениторных клеток клона [цит. обзор 25]. Чрезмерная экспрессия конституционно активной формы Notch4 в клетках грудной железы обуславливала подавление дифференцировки нормальных эпителиальных клеток. Было установлено, что сигнал Notch проявляет активность на нескольких стадиях развития этой железы. На ранних стадиях он действует как регулятор асимметричного клеточного деления (см. главу 6), а на более поздних стадиях способствует пролиферации миоэпителия [460]. В растущей скелетной мышце эмбрионов мышей комплексы Delta-Notch стимулировали пролиферацию предшественников миобластов путем экспрессии гена *Hes-1*, подавляющего экспрессию гена миогенина и MyoD [25].

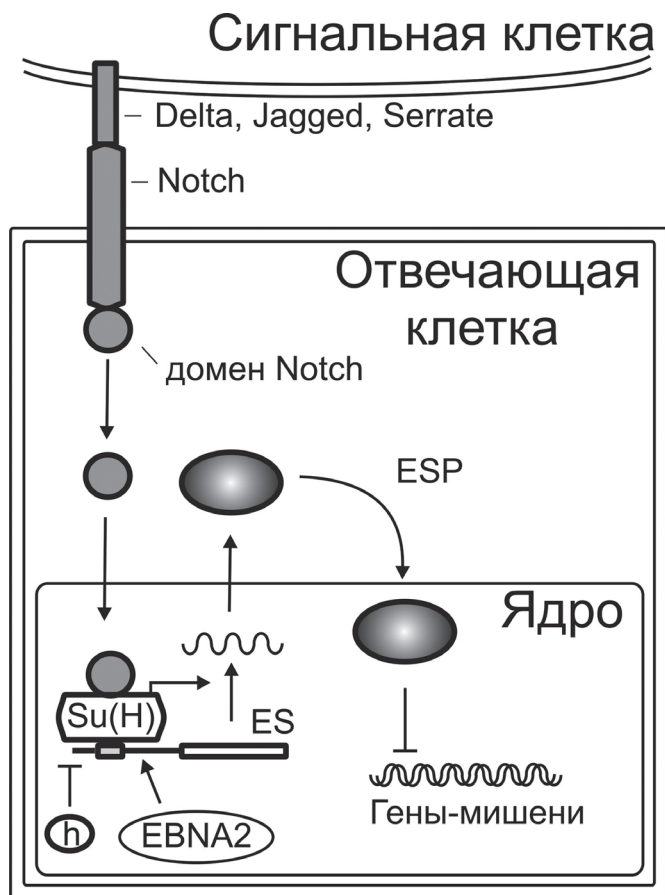


Рис. 4.2. Схематическая диаграмма сигнального пути Notch

Активация белков Notch после взаимодействия с лигандами (Delta, Jagged, Serrate) на поверхности клетки вызывает активацию рецепторов Notch. Расщепление внутримембранных комплексов сопровождается транслокацией внутриклеточного домена Notch в ядро клетки. В ядре домен Notch с некоторыми другими транскрипционными факторами, такими как Su(H) (Suppressor of hairless), активирует транскрипцию гена, называемого Enhancer of split (ES). Функция продукта этого гена — репрессорного белка (ESP), заключается в подавлении транскрипции специфического гена-мишени. Активация сигнальной системы Notch вызывает изменение судьбы клетки, включая самообновление СК или дифференцировку клеток-предшественников в определенном направлении. Белки Hairless (h) и EBNA2 стимулируют Su(H).

4.2.4. Фактор транскрипции Sox2

Ген *Sox2* относится к семейству генов *Sox*, которые кодируют факторы транскрипции, имеющие единственный высокомолекулярный белок, связывающийся с доменом ДНК. Подобно Oct3/4, фактор транскрипции Sox2 экспрессирован в плюрипотентных клетках ранних эмбрионов мыши, ВМБ, эпибласте и зародышевых клетках, но, в отличие от Oct3/4, он также представлен в мультипотентных клетках внеэмбриональной эктодермы и маркирует нейральные клетки-предшественники ЦНС. Снижение экспрессии Sox2 коррелирует с началом дифференцировки. Этот фактор транскрипции играет важную роль в создании или сохранении плюрипотентности на ранних стадиях развития эмбриона, причем эта роль настолько существенна, что материнский белок Sox2, в отличие от большинства других генных продуктов матери, сохраняется в клетках ранних эмбрионов до имплантации [178].

4.2.5. Сигнальная система Wnt/ β -катенин

Wnt — большое семейство секретрируемых цистеинсодержащих, гликопротеинов, у человека включающее 19 разновидностей. Многие из этих гликопротеинов выявляются у всех видов, начиная с дрозофил. Сигнальные белки Wnt играют основную роль в регуляции судьбы клетки, ее пролиферации и контроле асимметричного клеточного деления (см. главу 6). Белки Wnt переносят сигнал от поверхности клетки до ядра. Доставка сигнала зависит от присутствия в цитоплазме клетки белка β -катенина, который обычно связан с базальной мембраной E-кадгеринами. При отсутствии сигнала комплекс деструкции, состоящий из опухолевого супрессорного белка APC (Adenomatous polyposis coli), гликогеновой синтазы/киназы 3b (GSK3 β) и актина/кондуктина, связывает β -катенин и подвергает его сериновому фосфорилированию для разрушения. В результате этого процесса в цитозоле остаются только низкие уровни β -катенина (рис. 4.3.1). Рецепторами для секретрированных белков Wnt являются комплексы Frizzled (Fz), состоящие из 7 трансмембранных молекул и липопротеиновых (низкой плотности) рецепторов, связанных белками семейства 5/6 (LRP5/6). Связывание лиганда Wnt с его рецептором активирует цитоплазматический фосфопротеин Dishevelled (Dsh). Последний, в свою очередь, запускает каскад внутриклеточных сигналов, которые играют ключевую роль в подавлении опосредованного GSK3 β фосфорилирования β -катенина. В результате происходит накопление β -катенина в цитозоле. Нефосфорилированный β -катенин стабилен и переносится в ядро, в котором через посредство ДНК-связывающего белка активирует экспрессию специфических наборов генов мишеней [599]. В частности, он связывается с Tcf-4, членом семейства Tcf/LEF (T-cell factor/lymphocyte enhancer factor), и действует как кофактор активации Tcf, влияющий на транскрипцию и экспрессию многих генов, ответственных за пролиферацию клеток [цит. 440].

До недавнего времени большая часть хорошо охарактеризованного сигнального пути Wnt называлась каноническим путем, при котором лиганды Wnt действовали, повышая стабилизацию цитоплазматического белка β -катенина. Недавно было установлено существование других сигнальных путей Wnt, независимых от β -катенина, которые признаны решающими на некоторых этапах развития эмбрионов позвоночных [763].

Неканонический сигнальный путь Wnt включает рецепторы Frizzled и протеогликановый ко-рецептор Knypek. Цитоплазматический сигнальный белок трансдукции Dishevelled (Dsh) своим доменом DEP связан с клеточной мембраной. Dsh активирует небольшие ферменты семейства Rho или может вызывать высвобождение кальция из клетки, а затем активировать чувствительные к кальцию киназы: белковую C-киназу и кальмодулин-зависимую киназу II. В результате активации этого пути индуцируется сложная и динамичная клеточная реакция [763].

В последние годы получены доказательства прямой роли сигнала Wnt в самообновлении СК КМ, эпидермы и кишечника [120, 630]. Члены семейства Wnt участвуют в остеогенезе МСК [108, 182]. Мутации корецепторов Wnt LRP5 приводили к образованию дефектной кости, а полная потеря функции Wnt вызывала потерю массы и твердости кости [74]. Трансдукция ретровирусами

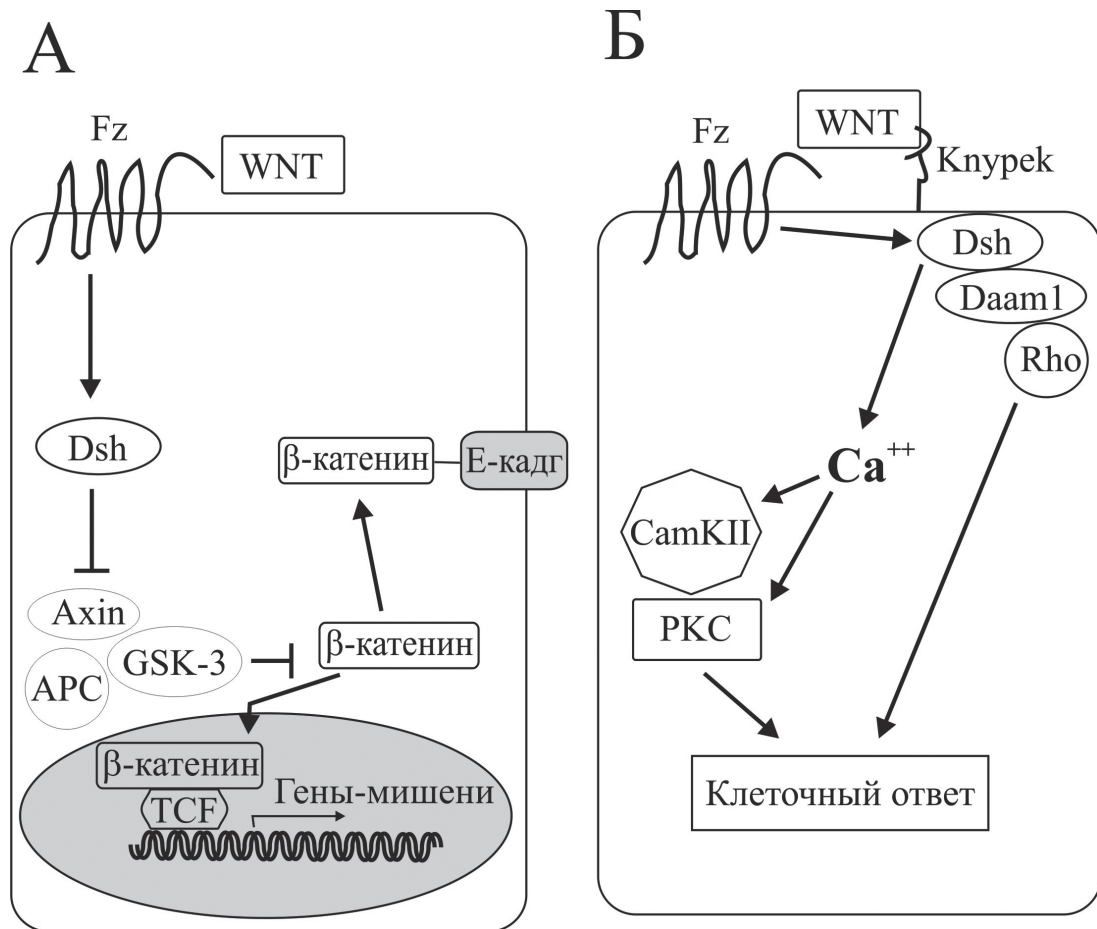


Рис. 4.3. Схематическая диаграмма канонического и неканонического сигнального пути Wnt

А) В отсутствие сигнала Wnt: в цитоплазме клетки находится β -катенин, связанный с базальной мембраной E-кадгерином. Комплекс деструкции (APC, GSK3 β и аксин-кондуктин) связывает β -катенин и подвергает его сериновому фосфорилированию для разрушения. В результате в цитозоле будут сохраняться только низкие уровни β -катенина.

Б) При наличии сигнала Wnt: связывание Wnt лиганда с рецептором активирует фосфопротеин цитоплазмы Dsh, который высвобождает каскад внутриклеточного сигнала, подавляющий фосфорилирование β -катенина. Происходит накопление β -катенина в цитозоле. Он переносится в ядро, связывается с Tcf-4 (членом семейства Tcf/LEF) и действует как его кофактор, влияя на транскрипцию и экспрессию многих генов, ответственных за пролиферацию клеток.

(А) Канонический путь Wnt/ β -катенин. Для этого сигнального пути необходимы рецепторы Fz, активирующие Dsh. Dsh подавляет активность комплекса разрушения β -катенина, который в отсутствие лигандов подвергает β -катенин фосфорилированию. При неактивном комплексе β -катенин стабилизируется и переносится в ядро, где комплексует трансаактиваторы из группы высокомолекулярных ДНК-связывающих белков семейства LEF/TCF.

(Б) Неканонический сигнальный путь Wnt. Для этого сигнального пути необходимы рецепторы Fz и протеогликановый корорецептор Knypek. Dsh своим доменом связан с клеточной мембраной. С основным потоком Dsh увлекаются небольшие молекулы GTP-аз семейства Rho. Для активации ферментов Rho под влиянием Dsh необходима связывающая молекула Daam 1. Dsh стимулируют высвобождение кальция и активацию чувствительных к кальцию белковой киназы C (PKC) и кальмомодулин-зависимой белковой киназы II (CamKII). В результате активация этого пути индуцирует сложные и динамические клеточные реакции.

активированного β -катенина приводила к резкому увеличению самообновления эпидермальных СК и снижению дифференцировки. На трансгенных мышях было показано, что сверхэкспрессия лигандов Wnt в строме грудной железы или повышение содержания активированного β -катенина в ее эпителии приводит к повышению содержания СК в этом органе [458].

При экспозиции МСК с Wnt3a, прототипом канонического сигнала Wnt, в стандартных культуральных условиях роста, наблюдали значительно повышенную клеточную пролиферацию и снижение апоптоза [108]. При экспозиции МСК с кондиционированной средой Wnt3a или чрезмерной экспрессии эктопического Wnt3a во время остеогенной дифференцировки выявляли подавление остеогенеза *in vitro* через опосредованное β -катенином снижение активности Tcf [108]. При этом резко снижалась экспрессия некоторых специфических генов остеобластов, например, ЩФ, костного сиалопротеина и остеокальцина, тогда как экспрессия Cbfa1/Runx2, раннего остеоиндуцирующего фактора транскрипции, не изменялась. Это свидетельствует о том, что опосредованный Wnt3a канонический сигнальный путь необходим, но не достаточен, чтобы полностью блокировать остеогенез МСК [74]. С другой стороны, *Wnt5a*, типичный неканонический ген Wnt, содействует остеогенезу *in vitro* [108]. Так как Wnt3a способствует пролиферации МСК во время раннего остеогенеза, предполагают, что канонический сигнал Wnt действует через инициацию раннего остеогенного подключения путем увеличения числа предшественников костных клеток в популяции СК, тогда как неканонический Wnt управляет превращением прогениторных клеток кости в зрелые функционирующие остеобласты [74].

4.2.6. Регуляторный фактор Bmi-1

Bmi-1 — репрессор факторов транскрипции. В настоящее время известно, что у взрослых Bmi-1 является основным регулятором самообновления КСК ГСК [574]. Также была установлена важная роль этого репрессора в самообновлении НСК [513]. В эпителиальных клетках грудной железы Bmi-1 регулирует экспрессию теломеразы [199]. Хотя механизмы, посредством которых Bmi-1 регулирует самообновление СК, остаются неизвестными, геном, противодействующим данному регулятору, может быть *P-16* [574]. Но, так как ген *P-16* только частично влияет на действие Bmi-1 в НСК, предполагают также участие других факторов в эффектах Bmi-1 на самообновление СК.

4.2.7. Фактор транскрипции Nanog

Nanog — фактор транскрипции, участвующий в самообновлении ЭСК. Ген *Nanog* является дополнительным геном гомеобокса и у мышей экспрессируется в клетках морулы, бластоцисты, эмбриональной карциномы, ранних зародышевых клетках и отсутствует в дифференцированных клетках. При повышенной экспрессии *Nanog* уменьшается зависимость ЭСК мыши от наличия LIF. Но, хотя клетки при этом размножаются и сохраняют плюрипотентность в отсутствие LIF, их способность к самообновлению снижается. Таким образом, сверхэкспрессия *Nanog* не полностью освобождает клетки от LIF-зависимости. При наличии обоих факторов они действуют синергично. Сверхэкспрессия *Nanog* не исключает потребности ЭСК мыши в активности *Oct3/4*; и как *Nanog*, так и *Oct3/4* необходимы для самообновления этих клеток. Разрушение *Nanog* в ЭСК мыши приводит к дифференцировке клеток во внеэмбриональную энтодерму. Следовательно, если *Oct3/4* предназначен для подавления конверсии ЭСК в трофо-эктодерму, *Nanog* необходим на одной стадии позже для ингибиции дифференцировки ЭСК в примитивную энтодерму [178].

Гены-мишени, с которыми связан *Nanog*, еще не известны, но последовательность ДНК, соответствующая *Nanog*, установлена [511]. На основании этой последовательности предполагают, что одним таким геном может быть *GATA6* [253]. *Nanog* также экспрессирован в ЭСК, ЭЗК, клетках эмбриональной карциномы и некоторых других опухолей человека. Можно предполагать, что *Nanog* у человека и мыши обладает функциональной гомологией, но эта проблема еще подлежит исследованию.

4.2.8. Регуляторные функции костных морфогенетических белков

Костные морфогенетические белки (BMPs) — представители семейства трансформирующих факторов роста, являются важными регуляторами пролиферации клеток и имеют большое значение в развитии органов и тканей. На тканях кишечника, например, было показано, что молекулы BMP связываются со своими рецепторами типа II, мобилизуют рецепторы типа I и трансдуцируют сигнал в ядро клетки через факторы транскрипции Smad. Антагонистом сигнала BMP является Noggin (Nog) — экстраклеточный белок, связывающий BMPs и предупреждающий их активность. Подавление этого механизма в кишечнике приводит к характерной форме роста эпителия и развитию эктопических крипт, располагающихся перпендикулярно к оси крипта-ворсинка.

4.2.9. Микрорибонуклеиновые кислоты

МикроРНК (miRNAs) — дополнительные регуляторы, также вовлекающиеся в поддержание свойств СК. Известно, что эти короткие молекулы РНК участвуют в регуляции трансляции, чаще всего путем подавления последней, а в некоторых случаях регулируют разрушение мРНК. Исследования, проведенные в последнее время на ЭСК мыши, выявили новые типы miRNAs, экспрессированные в недифференцированных клетках при сравнении с дифференцированными. Предполагают роль этих молекул в развитии эмбриона и в сохранении плюрипотентности ЭСК мыши. При изучении недифференцированных ЭСК человека выявили 17 новых mi-RNAs, 11 из которых были гомологичны описанным в ЭСК мыши [цит. 178].

4.3. Взаимодействие путей самообновления стволовых клеток

В организме сигнальные пути, регулирующие самообновление СК, интенсивно взаимодействуют. In vitro на клетках грудной железы, полученных из маммосфер, установили, что активация пути Notch приводит к активации сигнальной системы HH, включающей повышенную экспрессию Ptch и Gli [460]. Эта активация блокируется ингибитором γ -секретазы, который подавляет сигнал Notch. Таким образом, предполагается, что HH действует, вызывая снижение сигнала Notch. Получены также доказательства, что в маммосферах активация системы HH его лигандами (Shh и Ihh) повышает экспрессию HES-1 — мишени пути Notch; и циклопамин — ингибитор HH — может блокировать этот эффект. На основании уже имеющихся данных предполагают, что сигнальные системы HH и Notch совместно образуют петлю обратной связи, регулирующую нормальное развитие СК (рис. 4.4) [460].

На рис. 4.4 показано, что сигналы обеих систем независимо друг от друга влияют на самообновление СК, вызывая повышение экспрессии Bmi-1, который идентифицируется как регулятор самообновления СК. Также показано, что сигнальная система Wnt может действовать через снижение как пути HH, так и пути Notch, и, следовательно, путь Wnt также является регулятором самообновления СК. Однако пока не установлено, могут ли пути HH и Notch регулировать самообновление СК через снижение других мишеней, кроме Bmi1.

В тонком кишечнике мыши чуть выше клеток Панета обнаружена экспрессия маркера НСК Mushasi-1 (Msh-1). У млекопитающих этот высококонсервативный РНК-связывающий белок вызывает повышение экспрессии транскрипционной репрессорной молекулы Hes-1, имеющей существенное значение для самообновления НСК и подавления их дифференцировки [цит. по 440]. Экспрессию Hes-1 выявляют в пролиферирующих клетках, мигрирующих из ниш кишечника. Предполагают, что сочетанная локализация Msh-1 и Hes-1 может характеризовать популяцию СК тонкого кишечника. мРНК Msh-1 также выявляют в клетках крипт толстого кишечника человека [377].

4.4. Стволовые клетки и рак

Отмечено много связей между СК и неоплазией. В связи с тем, что СК являются медленно делящимися, долгоживущими клетками, они в течение продолжительного времени могут подвергаться воздействию различных повреждающих факторов и накапливать мутации, вызывающие

неоплазию [210, 544]. Нормальные СК и раковые клетки обладают некоторыми общими свойствами, такими как способность к самообновлению и миграции, наличие теломеразных и анти-апоптозных механизмов, повышенная активность мембранных транспортеров, единство путей регуляции самообновления. В настоящее время имеются доказательства в пользу существования опухолевых СК при лейкемии, миеломе, опухолях мозга, раке грудной железы [Bonnet & Dick, 1997; 210, 693, 694]. Концепция, что карциногенез в грудной железе и других органах может быть результатом трансформации СК и/или прогениторных клеток, вызванной дезрегуляцией путей их самообновления, в последние годы получила новые подтверждения [460].

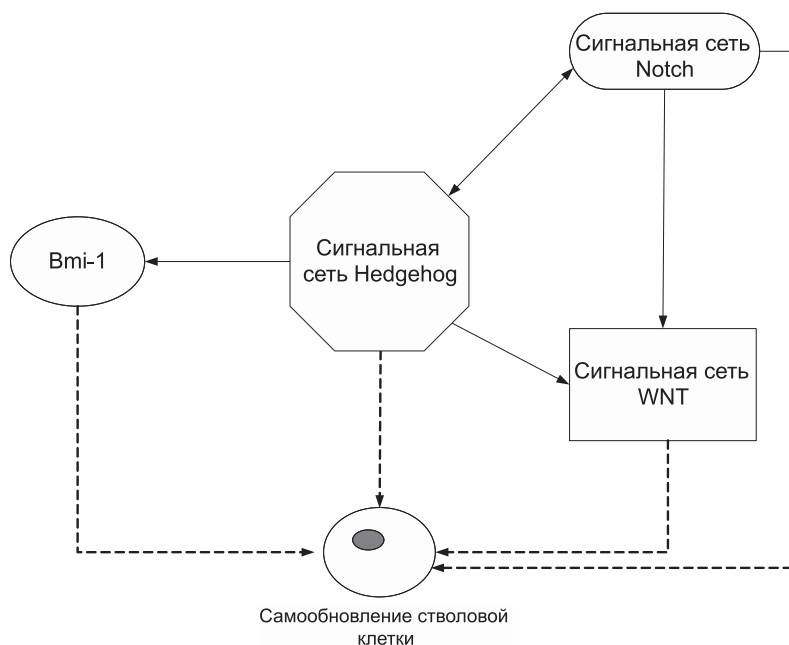


Рис. 4.4. Предполагаемая модель регуляции самообновления СК

(по Liu S., Dontu G., Wisha M. [460]. Пояснения в тексте)

Многие исследователи показали, что только очень небольшая часть клеток злокачественных опухолей человека способна к самообновлению. При раке грудной железы свойства СК были обнаружены у клеток субпопуляции с фенотипом $ESA^+ CD44^+ CD25^{-/low} Lin^-$. Всего 100 таких клеток, выделенных из первичной карциномы грудной железы человека или из метастазов, было достаточно для возникновения опухоли у мышей NOD/SCID с ослабленным иммунитетом. Напротив, десятки тысяч клеток того же происхождения, но не экспрессирующих этот фенотип, были неспособны вызвать опухоль в данной модельной системе [460].

Другие исследователи [Ricci-Vitiani, 2007; Eramo, et al., 2008] подтвердили, что только очень небольшие субпопуляции CD133-позитивных клеток человека из колоректальных аденокарцином и всех главных форм опухолей легкого ведут себя как рак-инициирующие клетки, т. е. стволовые клетки рака. Эти клетки пролиферируют в культуре в недифференцированном состоянии, поддерживают рост опухолей у мышей NOD/SCID после ксенотрансплантации и вызывают у мышей образование раковых опухолей, фенотипически не отличающихся от первичных опухолей человека. Причем было отмечено, что иницирующие рак клетки в глиобластоме, колоректальных и легочных опухолях много более резистентны к химиотерапевтическим препаратам, применяемым обычно в клинике, чем дифференцированные потомки этих опухолей [De Maria, цит. по 46]. Хеморезистентность опухолевых субпопуляций клеток может объяснить, почему во многих случаях рак прогрессирует во время лечения.

Сходные черты биологии СК и неоплазий проявляются в обнаружении у них некоторых общих регуляторных путей. Большое значение сигнальной системы НН в карциногенезе подтверждается теми данными, что многие гены, получающие сигнал НН, являются известными онкогенами (*Smo*, *Shh*, *Gli1* и *Gli2*), а *Ptch1* может функционировать как опухолевый супрессор [460]. Некоторые авторы [266] установили, что у трансгенных мышей к образованию опухолей СК эпидермы приводит повышенная активация сигнального пути Wnt. Имеются также данные, что белки Notch могут функционировать как протоонкогены, вовлекающиеся в карциногенез при дезрегуляции, например, самообновления нормальных СК грудной железы [704]. Наконец, роль в неоплазии может иметь регуляторный фактор Bmi-1, повышенная экспрессия которого выявлена в некоторых клеточных линиях грудной железы человека [199]. Предполагают, что при карциногенезе компоненты сигнальных путей могут быть удобными мишенями терапевтического воздействия [460]. Потенциальное преимущество среди методов лечения могли бы иметь те методы, которые не только обеспечивали бы специфическую элиминацию раковых СК, но сохраняли бы нормальные СК, зависящие от тех же механизмов самообновления. Последние работы показали, что ингибиторы сигнала НН, такие как циклопамин, могут подавлять опухолевые клетки грудной железы *in vitro* [408]. Сообщали также об элиминации медуллобластомы у трансгенных мышей низкомолекулярным ингибитором белка Shh — антагонистом НН (HhAntag) [646]. Эти работы предполагают, что лечение, направленное на механизмы самообновления СК в органе, может обеспечить новейший терапевтический подход для лечения рака грудной железы и других опухолей.

В последнее время получены убедительные доказательства наличия СК рака во многих типах опухолей мозга [258, 319], легких [384], почки [240], грудной железы [Al-Hajj и др., 2004]. В кровяной системе СК рака были впервые идентифицированы более 20 лет назад, когда Bonnet & Dick установили, что при остром миелоидном лейкозе человека клетки, инициирующие заболевание, имеют такой же фенотип клеточной поверхности (CD34⁺, CD38⁻), как нормальные КСК ГСК. СК рака также выявляли в чешуйчатой карциноме головы и шеи [Prince, et al., 2007], аденокарциноме ПЖ [Li, et al., 2007], карциноме щитовидной железы [De Maria, неопубл. цит., 46].

Одним из наиболее частых мест локализации новообразований является желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Неоплазии развиваются в этой системе вследствие огромного числа митозов и частой экспозиции клеток с карциногенами. Из-за быстрого оборота дифференцированным клеткам ЖКТ не хватает продолжительности своей жизни для накопления того количества мутаций, которое необходимо для злокачественного перерождения. Поэтому наиболее вероятной мишенью генетических мутаций является СК. Развитию колоректальной карциномы часто предшествует аденома, самым ранним проявлением которой может быть потеря контролирующего влияния на сигнал Wnt опухолевого супрессорного белка (APC; см. выше). Такой наследственный раковый синдром, как семейный аденоматозный полипоз, развивается из-за врожденной или спорадической мутации одного из аллелей APC [440]. Мутация другого аллеля превращает белок APC в неактивный, а неспособность «разрушительного комплекса» к фосфорилированию цитозольного β-катенина приводит к избыточной транскрипции генов мишеней. Клинически это вызывает образование множественных аденом кишечника во втором-третьем десятилетии жизни. Рак толстого кишечника неизбежен у этих больных, нуждающихся в профилактической колэктомии.

У 80 % больных спорадическим раком толстого кишечника также часто обнаруживаются мутации APC, причем у 50 % таких больных одновременно выявляются мутации молекул β-катенина, препятствующие их протеосомальной деградации гликогеновой синтазой-киназой-3β. У некоторых больных колоректальным раком обнаруживают мутации в других звеньях сигнального каскада Wnt или остальных регуляторных механизмов. Описаны сотни мутаций APC, но наиболее часто они отмечаются на экзоне 15 между кодонами 1250 и 1450, известными как регион кластерной мутации. Положение мутации, по всей вероятности, определяет время возникновения семейного аденоматозного полипоза и его тяжесть, так как различные мутации отличаются по способности аномального белка разрушать β-катенин [440].

Предложено несколько гипотез происхождения рака простаты, которые рассматривают участие в этом СК нормальной ткани простаты [Bonkhoff and Remberger, 1996], транзиторных амплифицирующихся клеток или дедифференцированных клеток люминального слоя [Liu и др., 1999]. Так как большая часть клеток первичного рака простаты имеет преимущественно люминальный фенотип с экспрессией цитокератина-8 и рецепторов андрогенов, первоначально предполагали, что опухоль возникает из клеток люминального или промежуточного типа. Однако при более тщательном исследовании срезов ткани рака простаты, окрашенных на цитокератины, обнаружили наличие в них небольшого числа клеток, экспрессирующих цитокератин-5-маркер клеток базального слоя. При исследовании срезов тканей больных метастатическим раком простаты обнаружили, что экспрессия цитокератина-5 прослеживалась у 28 % нелеченых больных, у 75 % больных с регрессией заболевания после отмены андрогенов и у 43 % больных с прогрессирующим заболеванием до развития независимости от андрогенов. Таким образом, хотя СК рака простаты пока не идентифицирована [Long, et al., 2005], все больше сходится в том, что это, вероятно, андрогеннезависимая клетка с базальным фенотипом, включающим экспрессию цитокератина-5 [Rizzo, et al., 2005].

Следует отметить, что клетки боковой популяции также были выявлены в некоторых раковых тканях, например, в нейробластоме и клетках глиомной линии C6, но сами по себе клетки SP были неспособны регенерировать рост опухоли у мышей. По данным Collins и др. [цит. Rizzo, et al., 2005], в тканях 40 больных первичным и метастазирующим раком простаты обнаружили приблизительно 0,01 % опухолевых клеток, которые имели фенотип $CD44^{+}/\alpha 2\beta 1^{hi}/CD133^{+}$. То есть у этих опухолевых клеток базальный фенотип был такой же, как у СК нормальной простаты, экспрессирующих цитокератины 5 и 14, но не цитокератин 18, PSA, PAP, рецепторы андрогенов или c-met. У более дифференцированных клеток, представляющих транзиторную амплифицирующуюся или коммитированную популяцию, фенотип клеток несколько отличался: $CD44^{+}/\alpha 2\beta 1^{hi}/CD133^{-}$ или $CD44^{+}/\alpha 2\beta 1^{low}$.

Как уже сказано, опухолевые СК, вследствие замедленной кинетики своего клеточного цикла, транспортных белков и антиапоптозных механизмов, могут проявлять резистентность к противоопухолевому лечению. Выбор в качестве мишеней лечения путей самообновления может обеспечить более специфический подход к элиминации СК рака. Работы последних лет показывают, что ингибиторы сигнала HH, такие как циклопамин, могут подавлять опухолевые клетки грудной железы *in vitro* [608, 646]. Низкомолекулярный ингибитор пути Shh, антагонист HH, элиминировал медуллобластому у трансгенных мышей без проявления токсичности [625]. Эти работы предполагают, что выбор в качестве мишени лечебного воздействия путей самообновления СК рака может обеспечить новейший терапевтический подход для лечения злокачественных заболеваний.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Al-Hajj M., Becker M. W., Wicha M., et al. Therapeutic implications of cancer stem cells // *Curr. Opin. Genet.* — 2004. — Vol. 14. — P. 43–47.

Bonkhoff H., Remberger K. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model // *Prostate.* — 1996. — Vol. 28. — P. 98–102.

Bonnet D., Dick J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // *Nat Med.* — 1997. — Vol. 3. — P. 730–737.

Eramo A., Lotti F., Sette G., et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population // *Cell Death Differ.* — 2008. — Vol. 15, N.3. — P. 504–514.

Li C., Heidt D. G., Dalerba P., et al. Identification of pancreatic cancer stem cells // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67, N.3. — P. 1030–1037.

Liu A. Y., True L. D., Latray L., et al. Analysis and sorting of prostate gene regulation and cytodifferentiation // *Prostate.* — 1999. — Vol. 40. — P. 192–194.

Long R. M., Morrissey C., Fitzpatrick J. M., et al. Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies // Clin. Sci. — 2005. — Vol. 108 — P. 1–11.

Prince M. E., Sivanandan R., Kaczorowski A., et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 2007. — Vol. 104, N. 3. — P. 973–978.

Ricci-Vitiani L., Pallini R., Larocca L. M., et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells // Nature. — 2007. — Vol. 445(7123). — P. 111–115.

Rizzo S., Attard G., Hudson D. L. Prostate epithelial stem cells // Cell Prolif. — 2005. — Vol. 38. — P. 363–374.

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

5.1. Классический иерархический путь развития

У млекопитающих нормальное сохранение ткани и восстановление ее после повреждения обеспечивается главным образом классическим, иерархическим, однонаправленным развитием линейной специфичности. Подобный путь развития начинается с ЭСК, сменяемых СК плода — первыми разновидностями резервных СК, которые самообновляются через асимметричное клеточное деление (см. главу 6) и образуют дифференцированные дочерние клетки. Эти клетки затем созревают в соответствии с предопределенным иерархическим направлением развития. Данная модель является доминантным путем развития и сохранения тканей, наиболее легко подтверждаемым экспериментально [736]. Клетки, перемещающиеся из одного региона эмбриона в другой, попадают под влияние нового микроокружения, способного изменить их путь развития. Такое изменение возможно только до определенной временной стадии развития клетки, после которой она становится уже «коммитированной» и не реагирует больше на факторы окружения. Эти наблюдения привели к гипотезе рестрикции (ограничения) генной экспрессии, обеспечивающей у клетки наступление состояния «конечной дифференцировки», из которого она уже не может выйти.

5.2. Рестрикция генной экспрессии

В стандартной модели дифференцировки судьба клетки определяется серией простых (обычно бинарных) процессов, которые необратимы и ограничивают клетку границами специфической линии. В соответствии с этой моделью судьбу клетки определяют два главных компонента: внешнее микроокружение — внеклеточные сигналы, воздействующие на клетку, и — внутренняя память клетки, т. е. особенности линии, в пределах границ которой она рестриктирована. Например, было показано, что клетки нервного гребня во время миграции и дифференцировки становятся не только коммитированными в какую-либо линию, но и рестриктированы в пределах ее границ. После трансплантации клеток нервного гребня в краниальные или каудальные регионы нейральной трубки они проявляют свою запрограммированную судьбу и коммитированность еще до появления явных морфологических или миграционных изменений [435].

В основе ограничения возможной судьбы клетки могут лежать два молекулярных механизма. Первый — пассивный — зависит от набора экспрессируемых клеткой белков. Если клетка не содержит белков, обеспечивающих ей реакцию на внутриклеточные и внеклеточные сигналы, соответствующие данному пути, она не сможет дифференцироваться в этом направлении. Второй механизм — активный, зависит от непрерывного подавления экспрессии (silencing) генов, которые являются регуляторами альтернативных линий [348]. В этом случае в клетке сохраняется память о ее происхождении в форме эпигенетических (т. е. некодируемых ДНК) изменений генома, которые превращают наборы специфических генов в пригодные или менее пригодные (рестриктированные) для транскрипции. В соответствии с таким эпигенетическим взглядом на дифференцировку клетке необходимо подвергнуться серии выборочных реакций (некоторые из них могут не иметь явной фенотипической экспрессии), которые приведут к конечному дифференцированному состоянию. Таким образом, репрессия или дерепрессия селективного гена на ранней стадии дифференцировки будет иметь последствием ограничение возможной судьбы клетки.

Дифференцировка вызывает избирательную активацию и подавление программ экспрессии специфических генов. Один возможный механизм ограничения судьбы клеток границами линии заключается в необратимом выключении генов альтернативных линий. Из работы Weintraub & Groudine [789] известно, что активные и подавленные гены имеют различную структуру хроматина, и это послужило первым аргументом в пользу заключения, что в транскрипционной регуляции большое значение имеет доступность ДНК.

У млекопитающих имеются два главных механизма эпигенетического контроля: метилирование цитозина ДНК и модификация гистоновых белков [348]. Метилирование ДНК ассоциируется с подавлением экспрессии генов, особенно при родительском (геномном) инбридинге и Х-инактивации. После синтеза ДНК дочерняя спираль метилируется в соответствии с родительской спиралью, сохраняя посредством метилирования структуру гена при прохождении через митоз. Опыты с применением трансгенов показали сохранение стабильности метилированной ДНК после более 50 делений.

Метилирование ДНК может также быть причиной рестрикции гена во время дифференцировки. Фибробласты, обработанные 5-аза-2'-дезоксцитидином (аналог нуклеотида, подавляющий метилтрансферазы ДНК), приобретали способность спонтанно дифференцироваться в целый ряд различных мезенхимальных линий, включая хондроциты, адипоциты и многоядерные миотрубочки [728].

Типы посттрансляционных модификаций гистоновых белков включают ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и убиквитинизацию (повсеместность). Все эти модификации коррелируют с транскрипционным состоянием хроматина: активное, подавленное или усиленное [348]. Наиболее известная посттрансляционная модификация гистонов — ацетилирование гистонов H4. Повышенное ацетилирование H4 коррелирует с активной транскрипцией и главные репрессорные комплексы содержат в своем составе множество гистоновых деацетилаз [736].

Для того, чтобы некоторые гены были надолго эпигенетически репрессированы, активные модификации, такие как ацетилированные формы гистонов H4, должны быть удалены. Недавно было показано, что деацетилазы гистонов имеют большое значение в определении клеточной судьбы и рестрикции линии. ГСК, культивируемые в присутствии гистоновой деацетилазы, трихостатина А, оставались мультипотентными и не дифференцировались даже в присутствии цитокинов, способствующих дифференцировке [507].

5.3. Обратимость генных рестрикций

Все эпигенетические средства линейного ограничения, такие как метилирование ДНК и модификация гистонов, могут быть нейтрализованы путем искусственных воздействий. Сверхэкспрессия отдельных факторов транскрипции может привести к полному изменению судьбы клетки. Например, сверхэкспрессия транскрипционного фактора Myo D в фибробластах превращает их в многоядерные миотрубочки [180]. Аналогично, сверхэкспрессия C/EBP α в зрелых В клетках вызывает превращение этих клеток в зрелые макрофаги с формированием выраженного макрофагального фенотипа, включающего такую функцию, как фагоцитоз [809]. Также известно, что цитоплазма ЭСК эффективно репрограммирует ядра, повышая ацетилирование гистонов и метилирование H3 Lys4. Крайним вариантом такого процесса является клонирование путем переноса ядра. Collas [161, 162] представил многочисленные доказательства возможности репрограммирования ядра клетки ядерными и цитоплазматическими экстрактами, продемонстрировав существование факторов, которые могут реверсировать эпигенетические модификации и даже идентифицировать их. Наконец, установлено, с приоритетом японских и американских исследователей, что некоторые дифференцированные клетки мыши и человека, в частности, фибробласты кожи, обработанные 4-мя генами, способны к превращению в индуцируемые плюрипотентные СК [722, 723, 816, 833] (подробнее см. главу 8).

На основании имеющихся не прямых доказательств можно заключить, что во время нормального развития может происходить отмена эпигенетического подавления экспрессии генов. В частности, при активации Т клеток в течение 7 ч. происходит активное деметилирование промоторов генов IL-2; спустя 15 ч. после активации только 13 % клеток входят в S фазу [128]. В этом случае деметилирование ДНК происходит как генноспецифическим, так и тканеспецифическим путями, и транскрипция IL-2 активно повышается.

5.4. Стохастичность и детерминизм в поведении клетки

В течение долгого времени обсуждалась проблема, является ли поведение клетки детерминированным (причинно обусловленным) или стохастическим (случайным или вероятностным). Способность выделить единичные ГСК из КМ и получить из них при культивировании колониеобразующие единицы (КОЕ) позволила провести сравнение поведения отдельных клеток. Хотя в некоторых опытах такого типа выявляли признаки детерминизма в поведении клеток, большая часть данных предполагает вариабильность дифференцировки клеток при инициации колониеобразования [Ogawa, 1999]. Например, различные комбинации дифференцированных в разной степени клеток обнаруживались в колониях, происходящих из единичных клеток [432]. При анализе колоний, полученных из спаренных клеток-предшественников, также выявляли вариабильность дифференцировки [432, 480]. Эту работу можно сопоставить с другими данными, показавшими, что индуктивные факторы микроокружения (цитокины, молекулы адгезии и т. д.) приводят к ограничению способности к дифференцировке [501]. Модели, которые имели ограниченную стохастичность, более четко отражают биологическое поведение клеток. На основании этих моделей был предложен ряд гипотез [255, 462, 463, 560, 640, 641, 736], авторы которых предполагают, что ограничение стохастичности является чем-то средним между противоположными идеями стохастичности и детерминизма.

Возможным источником стохастического поведения клеток крови при дифференцировке может быть, например, движение клеток по кровеносным сосудам, когда на клетки влияет высоко стохастическая жидкостная динамика, доставляющая их в различное микроокружение, где они подвергаются экспозиции с различным индуктивным влиянием. Большинство тканей, однако, не являются текучими и кажутся более стабильными. Но, если посмотреть на биомолекулярную динамику этих тканей на клеточном или субклеточном уровне, легко обнаружатся возможные источники стохастичности.

Работы из лаборатории Quesenberry [165, 166] продемонстрировали, что способность клетки к дифференцировке связана с ее временным нахождением в клеточном цикле. Авторы обнаружили в клеточном цикле «горячие пятна» (hotspots) дифференцировки, в которых можно было обнаружить долговременную, кратковременную или линейно ограниченную реконституцию. Одним из проявлений активного клеточного цикла является перемоделирование хроматина [Panicker & Rao, 2004; 573], с которым связано непрерывное изменение доступа транскрипционных факторов в место их регуляторного действия. Перемоделирование хроматина, в свою очередь, ведет к непрерывным изменениям генной экспрессии, в частности, рецепторов цитокинов, молекул адгезии и т. д. Таким образом, стохастичность входа в клеточный цикл связана со стохастичностью генной экспрессии и дифференцировки.

5.5. Теория сложности и возникновение клеточных феноменов

Клетки и клеточные линии являются примерами сложных адаптивных систем, которые при приобретении некоторых свойств самоорганизуются в развивающиеся структуры. Легко приспосабливающийся (адаптивный) характер этих структур позволяет им изменять свою организацию и поведение, сохраняясь при этом как реальность [736, 789]. В то же время клетки представляют собой самоорганизующиеся образования, возникающие от взаимодействия биомолекул, т. е. самостоятельных единиц более низкого уровня. Эти единицы также соответствуют большей части требований для сложных систем: они многочисленны, взаимодействуют между собой, следуя определенным молекулярно-химическим реакциям, и во время этого взаимодействия образуют гомеостатические сигналы обратной связи.

Прежде поведение и дифференцировка клеток описывались как проявления неопределенности [733, 737, 738]. Наблюдение или иное взаимодействие с клеткой неизбежно изменяет ее микроокружение, и, следовательно, влияет на состояние дифференцировки или способность клетки к этому процессу. Возможно ли создание совершенной машины, которая бы обеспечива-

ла получение полной характеристики клетки *in situ*, оставляя ее неизменной? Пока приходится констатировать, что клеточная неопределенность не является артефактом, вызванным технологической отсталостью, а является фундаментальным свойством клеточной природы [736, 789]. Пластичность, стохастичность, неопределенность и сложность характеризуют клетку в данный период времени. Как скоро удастся использовать выявленный потенциал организма, будет зависеть от того, как быстро мы освободимся от связывающих нас догм. То, что резервная СК с неповрежденным геномом может стать любым клеточным типом, открывает изумительную массу возможностей для клеточной терапии. Изменения в наших биологических представлениях происходят. Мы только должны помочь нашему сознанию выдержать современный темп новых открытий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Ogawa M. Stochastic model revisited // *Int. J. Hematol.* — 1999. — Vol. 69. — P. 2–5.

Panicker M. M., Rao M. Stem cells and neurogenesis // *Stem cell Biology*. Eds. by Marshak D. R., et al. Cold Spring Harbor. Lab Press. — 2004. — P. 399–438.

ГЛАВА 6. ЭКСПАНСИЯ РЕГИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

6.1. Асимметричное клеточное деление региональных стволовых клеток

В отличие от ЭСК, которые в культуре *in vitro* могут расти неопределенно долго, хорошо известны трудности, с которыми сталкиваются при попытке размножить *ex vivo* региональные СК. Одна из причин этих затруднений — асимметричное клеточное деление, присущее СК постнатальных соматических тканей [679]. Несмотря на то, что асимметричное клеточное деление является важной характеристикой нормальных тканей млекопитающих, его часто упускают из вида при изучении СК. Между тем, если асимметричное клеточное деление врожденная особенность региональных СК, оно может оказывать значительное влияние на выделение и экспансию этих клеток. Трудности размножения региональных СК в культуре — главное препятствие развития этих клеток для применения в качестве заместительной терапии в клинике [494, 769].

В организме на функцию региональных СК оказывает существенное влияние ряд биологических механизмов, разрушение которых *ex vivo* может препятствовать их экспансии. Среди этих механизмов сигналы ростовых факторов, контакты экстраклеточного матрикса, сохранение теломеров, взаимодействие клетки с клеткой и асимметричное клеточное деление [679]. Выяснение закономерностей функционирования генов, регулирующих асимметричное деление клеток, и белков, кодируемых этими генами, может обеспечить успешные действия по экспансии региональных СК в культуре.

Во многих работах последнего времени предполагается, что региональные СК, происходящие из какой-либо одной ткани, способны к трансдифференцировке, т. е. при переносе в окружение другой ткани могут образовать клетки, проявляющие экспрессию некоторых генов этой последней ткани. В частности, клетки, происходящие из КМ, способны образовать клетки со свойствами, специфическими для гепатоцитов печени [402, 419, 589], нейральных клеток [117, 504] и миоцитов сердца [562]. Явление трансдифференцировки региональных СК можно объяснить на основе анализа их уникальных дифференцировочных свойств. В постнатальных соматических тканях региональные СК остаются недифференцированными, хотя одновременно образуют высокодифференцированные клетки-потомки. Это оказывается возможным благодаря асимметричным клеточным делениям, в результате которых возникают транзиторные дочерние клетки и новые СК, заменяющие исходные материнские клетки. В зависимости от типа ткани транзиторные дочерние клетки либо сразу дифференцируются, либо вначале делятся, чтобы обеспечить разнообразие клеточных типов, образующих ткань [230, 237]. Прежде для объяснения такого характера поведения клеток в постнатальных тканях предполагали, что еще во время эмбрионального периода клетки, которым предназначено стать региональными СК, подвергаются рестрикции (ограничению) плюрипотентности с сохранением мультипотентности, бипотентности или унипотентности. Мультипотентные и унипотентные СК способны к образованию, соответственно, многих или только одного типа, но не всех возможных типов клеток. Признание трансдифференцировки региональных СК приводит к необходимости дать другое объяснение ограничения потенциала развития этих клеток в тканях, в которых они находятся. Трансдифференцировка может быть обусловлена влиянием местных факторов окружения (сигналы от дифференцированных клеток и внеклеточных матриксов, растворимые факторы), вызывающих дифференцировку, в основном, транзиторных дочерних клеток и их потомков, тогда как находящиеся в этой ткани региональные СК сохраняют свое автономное недифференцированное мультипотентное состояние. Таким образом, не тканеспецифическая рестрикция потенциала СК, происходящая во время эмбрионального и фетального развития, а генетическое репрограммирование транзиторных клеток под влиянием сигналов окружающей среды является сущностью явления трансдифференцировки. Ряд работ поддерживает это альтернативное объяснение [157, 158].

Хотя асимметричное клеточное деление обычно признают в качестве основного признака региональных СК, связанную с этой особенностью асимметричную клеточную кинетику часто

упускают из внимания. Между тем, способность тканей взрослых млекопитающих к обновлению клеток при сохранении постоянной клеточной массы обусловлена как раз асимметричным делением региональных СК [131, 598]. Судьба всех транзитных дочерних клеток завершается терминальной задержкой деления, но только у СК способность к делению поддерживается в течение всей жизни млекопитающего [131, 393]. На протяжении трех десятилетий исследователи пытались найти точную математическую формулу асимметричного деления СК *in vivo* [393, 420, 791]. Некоторые авторы предполагают, что асимметричное деление возникает в пулах пролиферирующих региональных СК, в процессе деления которых стохастически образуются или новые СК, или дифференцированное потомство. Другие — утверждают, что асимметричное деление обеспечивают те СК, которые образуют при каждом делении в соответствии с установленной программой одну новую недифференцированную СК и одну дифференцированную прогениторную клетку. В любом случае, главный результат — это постоянное число тканевых региональных СК, способных образовать дифференцированные потомки, проявляющие перед концом своей жизни задержку деления. Возможные способы образования дифференцированных потомков при делении СК представлены на рис. 6.1.

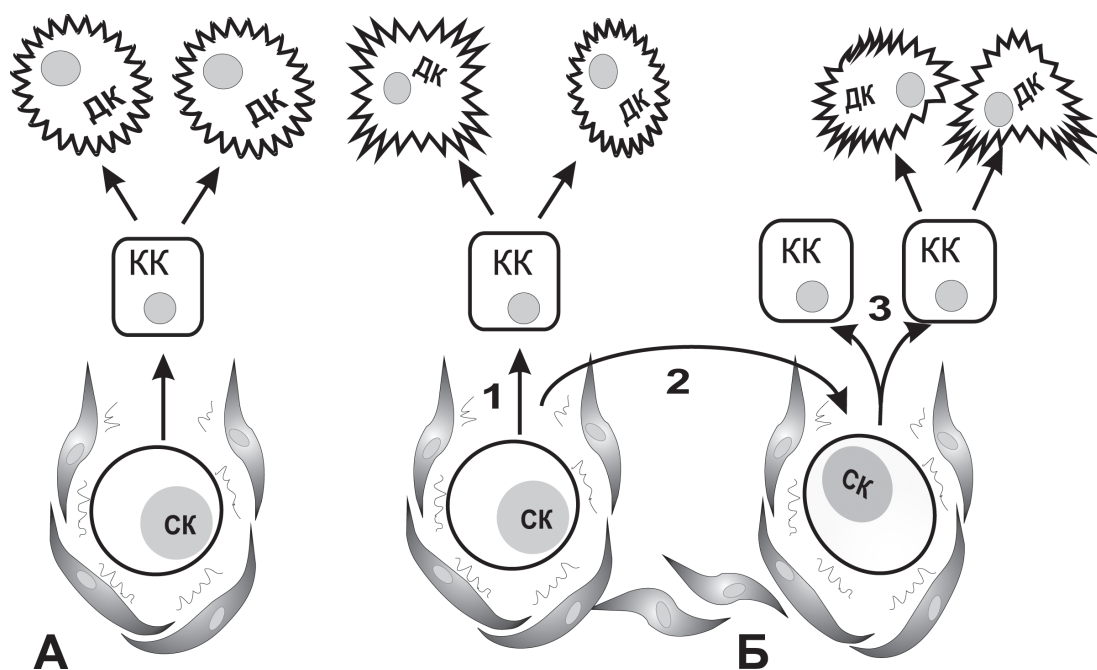


Рис. 6.1. Варианты образования дифференцированных потомков при делении СК

А — безальтернативный вариант — СК при делении дает одну коммитированную клетку (КК), которая дифференцируется в один тип дифференцированных клеток (ДК);

Б — популяционный вариант — стволовая клетка дает рост дочерней клетке, которая может быть или коммитированной (1), или стволовой (2); или исходная стволовая клетка делится на две коммитированные клетки (3).

Было предположено, что врожденное асимметричное клеточное деление региональных СК является главнейшим барьером роста этих клеток в культуре [Rambhata et al., 2001]. *Ex vivo* в результате продолжения клеточной программы деления происходит нарастание числа неделящихся клеток без соразмерного увеличения числа СК. При разведении культуры с целью ее размножения СК, которые не изменялись в числе, разводятся еще больше по сравнению с возрастающей численностью неделящихся клеток. Предполагают, что такая клеточная кинетика обуславливает репликативное старение диплоидных клеток млекопитающих в культуре и является главным

препятствием размножению и экспансии региональных СК *ex vivo* [499; Rambhatla et al., 2001]. Ключ к решению проблемы экспансии региональных СК может быть найден после выяснения природы молекулярных механизмов, регулирующих асимметричное деление [679].

Во время начальной фазы эмбрионального развития происходит, вероятно, много фенотипически отличающихся асимметричных клеточных делений, но более часто осуществляется симметричное клеточное деление, которое приводит к образованию двух клеток с одинаковой способностью к делению. Первое появление СК с асимметричным клеточным делением происходит у плода к началу формирования архитектуры тканей. Гены, вовлекающиеся в регуляцию асимметричного клеточного деления, могут быть экспрессированы в самих СК или в клетках, взаимодействующих со СК. Эти гены должны находиться в фокусе внимания исследователей, изучающих природу ниши СК.

6.2. Генетические регуляторы асимметричного клеточного деления

Целый ряд работ посвящен описанию генов, экспрессия которых в клетках, соседствующих с региональными СК, может изменять деление и дифференцировку региональных СК [252, 708, 784]. Возможно, что подобные внешние механизмы действительно оказывают влияние на асимметричное деление региональных СК, но в большей степени деление региональных СК млекопитающих регулируют, очевидно, гены, функционирующие автономноклеточным образом [679]. Один такой ген определился уже при первых наблюдениях за асимметричным делением клеток. Он оказался супрессорным геном *p53* эпителиальных клеток опухоли молочной железы взрослых мышей. При повышении на 50 % базального уровня эндогенного *p53* в этих клетках наблюдали индукцию переключения от симметричного деления клеток к асимметричному, характеризующемуся получением в процессе деления одной непрерывно делящейся дочерней клетки и одной дочерней клетки, задержанной в фазе G1/S клеточного цикла [680]. Такой же тип клеточного деления обнаружили в стареющих культурах фибробластов плодов мышей и легких человека. Эти наблюдения привели к предположению, что зависимое от *p53* асимметричное деление клеток является главнейшим препятствием размножения клеток взрослых соматических тканей в культуре [499; Rambhatla et al., 2001]. В дальнейшем было показано, что выявленные *in vitro* данные в отношении *p53* полностью подтверждаются *in vivo*. Было получено несколько различных линий трансгенных нокаутных по гену *p53* мышей. Клетки из различных тканей таких мышей не старели в культуре [300, 755]. Отсутствие старения культур клеток при нулевом уровне *p53* согласуется с отменой барьера асимметричного деления при экспансии региональных СК после снятия регуляции, зависимой от *p53* [499; Rambhatla et al., 2001]. При изучении культуры клеток *in vitro* было установлено, что экспрессия *p53*, наряду со снижением активности клеток, вызывает также снижение уровней мРНК и белка инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы (*IMPDH*) — фермента, ограничивающего скорость синтеза гуаниновых нуклеотидов [678]. Хотя молекулярный механизм этой реакции не выяснен, все данные указывают на то, что такое снижение *IMPDH* необходимо для асимметричного деления клеток, зависимого от *p53*. Известно, что у человека часто проявляется связь гена *IMPDH* типа II со злокачественным ростом и другими высоко пролиферативными состояниями [679]. Примечательно также, что этот ген входит в недавно представленный набор генов, экспрессия которых связана с популяциями, обогащенными ГСК [591]. Однако на трансгенных мышах, нокаутных по гену *IMPDH* тип II, не удалось получить дополнительной информации о возможной роли *IMPDH* в делении региональных СК.

Еще один ген *p21^{Waf1/cip1/sdi1}* (*p21*) — универсальный ингибитор циклинзависимых киназ фаз G1 и S клеточного цикла — известен как *p53*-зависимый ген-мишень много больше, чем *IMPDH*. Со времени открытия *p21* рассматривается как основной медиатор *p53*-зависимой задержки деления в фазе G1 в ответной реакции на агенты, повреждающие ДНК [De Lange et al., 1990; 224]. В последнее время предполагают также возможную роль *p21* в гомеостатическом контроле деления региональных СК. Кроме того, высказано мнение, что этот белок может быть переключающей молекулой, регулирующей вхождение ГСК в клеточный цикл. При его отсутствии

происходит частое включение СК в цикл, приводящее к истощению этих клеток [146]. При наличии *p21* долго сохраняется потенциал ранних клеток-предшественников, несмотря на экспансию клеток, вызванную цитокинами. Напротив, потеря экспрессии белка *p21* во время экспансии клеток приводит к дифференцировке ранних прогениторных клеток, развивающихся из CD34⁺ клеток [146]. У трансгенных мышей, нокаутных по гену *p21*, обнаруживают расширенный пул СК кератиноцитов или примитивных эпидермальных клеток-предшественников. Предполагают, что *p21* может функционировать автономно, регулируя пролиферацию и/или потенциал дифференцировки региональных СК кератиноцитов или очень примитивных предшественников кератиноцитов для эпидермиса и волосных фолликулов [747]. У нокаутных по гену *p21* мышей раньше проявляется раковый фенотип (хотя с более длинным латентным периодом, чем у мышей нокаутных по гену *p53*), причем 65 % выявленных опухолей оказываются гемопоэтическими по происхождению [146]. Также как при недостаточности *p53*, дефицит *p21* содействует повышению продолжительности жизни культивированных фибробластов человека [122]. В стареющих клеточных культурах экспрессия *p21* повышена [740].

Сразу посчитали маловероятным, что только *p53*, *IMPDH* и *p21* являются регуляторами асимметричного клеточного деления. Предположили, что к этому свойству клеток могут иметь отношение гены, влияющие на такие биологические особенности СК, как инертность, дифференцировка и апоптоз, а также ряд клеточных компонентов и даже такие небольшие молекулы, как гуаниновые рибонуклеотиды — мишени действия *p21* [146]. Прямая роль антиапоптозного белка BCL-2 в регуляции судьбы ГСК была заподозрена по аналогии с результатами исследований, проведенных на трансгенных мышах со сверхэкспрессией BCL-2. У таких мышей выявляли более высокое содержание ГСК в КМ при сниженном числе ГСК в фазах S/G2/M. Цикл ГСК у этих животных был замедленный, а способность к росту в культуре выше. Эти данные предполагают, что сверхэкспрессия BCL-2 способствует сохранению ГСК в незрелом состоянии [366].

В последнее десятилетие была установлена роль двух дополнительных генов, регулирующих деление региональных СК. Один из них, *p63*, является членом семейства генов *p53* [42; Yang & McKeon, 2000]. Различные транскрипционные единицы *p63* образуют варианты белков, которые могут либо транскрипционно активировать известные гены, реагирующие на повышение экспрессии *p53* (в том числе *p21*), или препятствовать *p53*-зависимой генной транскрипции. Экспрессия *p63* часто выявляется, подобно *p53*, в базальных клетках различных эпителиальных тканей [42; Yang & McKeon, 2000]. Эти данные показывают, что экспрессия *p63* не ограничена только эпителиальными СК, содержание которых в эпителии определяется как менее одной клетки на 10³ [131, 598]. В последнее время появились интересные данные о взаимосвязи между экспрессией *p63* и содержанием региональных СК в эпителии роговицы человека [49, 50]. В базальном слое края роговицы, содержащем медленно циклирующие *in vivo* СК, было обнаружено высокое содержание клеток с наивысшей пролиферативной способностью *in vitro* (так называемые голоклоны). Иммуногистохимическим анализом была выявлена частая экспрессия *p63* в этих клетках. Голоклоны, полученные из клеток роговицы (15 % от общего числа выращенных клонов), экспрессировали значительно более высокие уровни белка *p63*, чем клетки клонов с уменьшенной пролиферативной активностью. Подобное же взаимоотношение между пролиферативной способностью и экспрессией *p63* было отмечено в эпидермисе человека, образующим такие же, но более редкие (6,6 %) голоклоны, которые происходят, вероятно, из эпидермальных СК или более ранних предшественников [68].

Другой ген, участвующий в регуляции деления региональных СК, — *Pten*, также является известным супрессорным белком опухолей. Ген *Pten* кодирует фосфатазу, мутация которой отмечается при многих видах рака человека. Такие мутации в клетках зародышевой линии predisposing к ряду заболеваний, среди которых раковые синдромы и дефекты развития. Вероятно, из-за важной роли этого белка во время раннего эмбрионального развития получить традиционным методом трансгенных мышей нокаутных по гену *Pten* не удавалось. Все эмбрионы погибали. Поэтому были получены мыши *Pten* Cre-Ioxp, подвергнутые нокауту по гену *Pten* в клетках

ЦНС [390]. У этих мышей выявляли аномалию мозга, связанную с увеличенной пролиферацией нейральных клеток и сниженным их апоптозом. Исследования *in vitro* на культуре нейросфер из таких мышей показали, что недостаток гена *Pten* приводит к увеличению пролиферации НСК/прогениторных клеток. Эффекты этой мутации были специфичны для кинетики НСК, так как изменений дифференцировки клеток-предшественников не отмечали. Предполагают, что мутантные фенотипы у нокаутных по гену *Pten* мышей обусловлены участием этого гена в делении ЭСК, но не региональных СК [679]. Получение трансгенных мышей с индуцибельными генами *p63* и *Pten* позволит, вероятно, оценить влияние сверхэкспрессии этих генов на деление клеток в фетальных, неонатальных и взрослых тканях.

6.3. Наследование детерминант асимметричного клеточного деления

Важной особенностью асимметричных делений, которая характеризует дифференцировку клеток во время эмбрионального развития, является асимметричная наследственность. Факторы такой наследственности могут быть внутриклеточными или внеклеточными. Было показано, что дифференцирующиеся клетки асимметрично используют имеющиеся белки и РНК и проявляют неравномерную экспрессию специфических генов. В результате в дочерних клетках оказываются значительно отличающиеся количества решающих для судьбы клеток детерминант [304, 390]. Кроме того, дочерние клетки могут «наследовать» различные внеклеточные факторы, которые могут независимо влиять на судьбу клетки или повышать количество ее внутриклеточных детерминант, способных регулировать асимметричное деление.

Региональные СК *in vivo* могут использовать механизмы асимметричной наследственности для приобретения способности к асимметричному делению. Имеются доказательства, что ниши региональных СК играют роль в регуляции деления региональных СК [252, 708]. Однако, на основании наблюдений за асимметричными делениями в изолированных клетках *in vitro* [Rambhatla, et al., 2001; 680, 681] прежде всего напрашивается вывод о клеточно-автономном асимметричном наследовании детерминант асимметричного деления [679]. Пока не было проведено исследований по сравнительной оценке содержания пяти генов, о которых говорилось выше, в дочерних региональных СК, находящихся в цикле и вне цикла деления. Конечно, если бы обнаружили, что один (или несколько) из этих генов экспрессируются асимметрично, можно было бы прийти к пониманию молекулярной основы асимметричного деления клеток. Но тогда сразу же возникнет вопрос, какие клеточные механизмы обеспечивают клеточно-автономную асимметричную наследственность? Простое объяснение, что асимметричное деление может быть результатом стохастического распределения молекул «детерминант клеточного деления» между дочерними клетками, обманчиво. При той основной идее, что эта детерминанта свободно перемещается, маловероятно, что дочерние клетки будут наследовать строго одинаковое число молекул. Клетке, наследующей небольшое число молекул, каким бы оно ни было малым, будет, вероятно, предопределено стать СК, непрерывно находящейся в клеточном цикле. Но трудно представить себе биологический контрольный механизм, который бы на такой основе был бы способен функционировать тонко и надежно [679]. Синтез и обмен детерминант клеточного деления должен подвергаться строгому контролю, чтобы исключить возможность провальной программы деления, обусловленной стохастическим распределением решающего фактора. При условии существования единственной копии детерминанты клеточного деления, которую могла бы наследовать только одна дочерняя клетка, это могло бы быть приемлемым решением проблемы стохастического варьирования концентрации асимметрично наследуемой детерминанты. Например, эффективным механизмом могла бы быть единственная копия мРНК, образование которой может быть достигнуто двумя различными механизмами. Ген может быть такой большой длины или обладать такой слабой транскрипционной эффективностью, что перед каждым делением СК будет образовываться только один полный генный транскрипт. Но когда случайно эти механизмы выдадут дочерним клеткам больше одной копии или запустят неполную копию мРНК, такой исход будет катастрофичен для этих клеток *in vivo*. Кроме того, как и в

случае асимметричной наследственности, основанной на неравномерной концентрации молекул основной детерминанты, строгая координация синтеза и обмена единственной копии детерминанты с темпами клеточного деления также будет существенным требованием для обеспечения надежной функции.

Модель детерминанты с единственной копией для клеточно-автономной асимметричной наследственности станет более вероятной в случае принятия двух дополнительных условий [679]. Во-первых, детерминанта клеточного деления должна оставаться стабильной на протяжении всей жизни млекопитающего. Во-вторых, резко должно быть ограничено образование новых копий детерминант клеточного деления. При делении СК с единственной копией стабильной детерминанты только одна дочерняя клетка наследует эту детерминанту и становится новой СК. Другая дочерняя клетка, не получившая детерминанту, не сможет превратиться в СК, вследствие чего станет восприимчивой к факторам, запускающим программу дифференцировки.

Рассмотрена также другая возможность, что проблема приобретения клеткой способности к асимметричному делению определяется не на клеточном уровне, а в процессе специфической связи возникших дочерних клеток. Обе дочерние клетки могут «конкурировать» между собой за восприятие программы дифференцировки. Победившая в этой «конкуренции» клетка должна начать дифференцировку, тогда как другая клетка продолжит функционирование в качестве СК. Взаимодействующие регуляторные факторы должны обеспечить точный механизм, гарантирующий асимметричное деление потомкам СК [679].

6.4. Роль внешних факторов в реализации асимметричного клеточного деления

В настоящее время нет рационального решения проблемы экспансии региональных СК в культуре. Пока внимание исследователей сфокусировано на определении специфических факторов роста и клеточных белков, способствующих размножению СК *in vitro*. Объектами в подобных исследованиях являются факторы, которые повышают жизнеспособность, пролиферацию и репликативную продолжительность жизни региональных СК или предупреждают клеточную дифференцировку. Такие исследования важны для понимания функции СК, но вряд ли они приведут к решению проблемы экспансии, если не будут сопровождаться изучением барьера, создаваемого наследственным асимметричным делением. Для выяснения роли генов асимметричного клеточного деления в кинетике региональных СК необходимы данные о полной генетической структуре контрольных механизмов деления региональных СК. Успехи в изучении молекулярных и биохимических особенностей этого процесса составят основу первого этапа в развитии биоинженерных методов размножения региональных СК в культуре с целью получения их в количествах, необходимых для клиники.

Образование организованных тканей во время нормального эмбриогенеза контролируется многими индуктивными сигналами и комплексом эпителиально-мезенхимальных взаимодействий. Такие же сигналы и взаимодействия имеют место в окружении СК, но из-за того, что еще не полностью раскрыты точные индуктивные элементы, часто нет возможности воспроизвести *in vitro* направление дифференцировки СК.

Работы последнего времени показывают, что внешние сигналы, обеспечивающие микроокружение СК или ее «ниши» (растворимые факторы и белки адгезии) играют главную роль в асимметричном делении СК и сохранении их пула [159, 764–766]. Экспансия клеток кордовой крови на фидерном слое из МСК привела к увеличению в 7,7 раза общего количества клеток, инициирующих колониеобразование, и к увеличению в 3,8 раза содержания ранних CD34⁺ клеток-предшественников (CD38⁻/HLA-DR⁻)[366]. В цитоплазме прогениторных клеток, размноженных на МСК, выявляли более высокую экспрессию ингибитора клеточного цикла p21 и антиапоптозного белка BCL-2, по сравнению с гемопоэтическими клетками кордовой крови, размножаемыми только с использованием цитокинов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

De Lange T., Shiue L., Myers R., et al. Structure and variability of human chromosome ends // Mol. Cell. Biol. — 1990. — Vol. 10. — P. 518–527.

Rambhatla L., Bohn S.A., Stadler P.B., et al. Cellular senescence: ex vivo p53-dependent asymmetric cell kinetics // J. Biomed. Biotech. — 2001. — Vol. 1. — P. 27–36.

Yang A., McKeon F. P6 3 and P7 3: P5 3 mimics, menaces and more // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2000. — Vol. 1. — P. 199–207.

ГЛАВА 7. ПЛАСТИЧНОСТЬ РЕГИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

7.1. Сущность и проявления пластичности стеловых клеток

Первоначально предполагали, что региональные СК тканеограничены, т. е. способны к образованию только отдельных клеточных линий из числа представленных в любой рассматриваемой ткани. Но скоро эта концепция пришла в противоречие с большим числом наблюдений, показавших, что региональные СК обладают скрытым потенциалом развития, обеспечивающим этим клеткам пластичность.

Одна из наиболее ранних работ в этом направлении была проведена в 1998 г. Ferrari и др. [237]. Авторы трансплантировали беспородным мышам КМ трансгенных мышей, все клетки которого экспрессировали ген LacZ под контролем специфического для мышц промотора. Спустя несколько месяцев после трансплантации КМ в нижнюю часть мышцы задней конечности реципиентов была сделана инъекция змеиного яда, вызвавшего воспаление, закончившееся регенерацией скелетной мышцы. При исследовании этой мышцы спустя 2–3 недели после повреждения в ней обнаружили значительное количество LacZ-позитивных волокон. Прямое введение донорских клеток КМ в поврежденную скелетную мышцу также сопровождалось появлением в ней LacZ-позитивных мышечных волокон.

Учитывая тесную взаимосвязь гемопоэза и васкулогенеза в процессе эмбриогенеза, несколько групп исследователей изучили наличие в КМ прогениторов с васкулогенным потенциалом [65, 683]. Было установлено, что через 6–8 месяцев после трансплантации КМ под влиянием цитокинов и ишемического стресса, способствующих неоваскуляризации, в сосудистом русле реципиентов обнаруживались клетки-предшественники эндотелия донорского происхождения. Другие сообщения такого же плана касались ГСК и утверждали, что происходящие из КМ клетки могут содействовать *in vivo* регенерации печени [49, 50, 419, 589, 593, 734, 740]. Затем была выявлена пластичность ГСК по отношению к другим органам, таким как мозг [117, 222, 503, 504], сердце [318, 561–563], скелетные мышцы [259, 286, 346] и поджелудочная железа [316, 335]. Показано также участие ГСК в формировании циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), способных при наличии факторов роста образовать в ответ на повреждение новые кровеносные сосуды [275, 674].

В тот же период времени было установлено, что пластичность присуща не только ГСК. Было показано, что НСК, кроме способности к образованию трех главных типов клеток, обнаруживаемых в мозгу взрослых — нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, могут обеспечивать появление кроветворных прогениторных клеток [81, 99], а МСК, которые образуют многочисленные мезенхимальные фенотипы, могут еще вызывать образование немезенхимальных линий клеток, например, нейрогенных. Более того, чтобы соответствовать повышенному запросу в клетках-предшественниках, который отмечается во время активного роста или восстановления ткани, взрослый организм обладает способностью мобилизовать некоммутированные прогениторные клетки из других тканевых источников. Так, во время восстановления мышечной ткани СК из КМ могут перемещаться в скелетные мышцы. Этот факт и другие такого же типа выявили еще одно примечательное свойство региональных СК, которое заключается в их способности оставлять собственную тканевую нишу и перемещаться с потоком крови. Однако для осуществления новой программы дифференцировки циркулирующие СК должны попасть в соответствующее микроокружение [99, 510]. Было установлено, что клетки ПЖ могут трансдифференцироваться в гепатоциты как *in vitro* [677], так и *in vivo* [403], причем ни образования гетерокарионов, ни слияния клеток при этом не происходит. В КМ крыс и человека была выявлена на основании отсутствия β_2 -микроглобулина и экспрессии Thy-1 популяция клеток $\beta_2m^-/Thy-1^+$, обладающих наличием специфических для печени генов и функций [68]. После вливания в воротную вену печени крыс эти клетки присоединялись к пластинкам гепатоцитов и дифференцировались в зрелые гепатоциты. В поврежденной печени СК, происходящих из КМ, было больше.

Дифференцировку СК КМ в зрелые гепатоциты можно было наблюдать *in vitro* в культуральной системе, которая имитировала регенерацию печени и содержала сыворотку животных с перевязанным желчным протоком. Предположили, что такая сыворотка является источником важного, но пока не установленного сигнала. При культивировании СК КМ со здоровыми гепатоцитами такого эффекта не наблюдали.

Клетки, происходящие из КМ, могли также дифференцироваться в кардиомиоциты. У мышей самок прямая инъекция Lin⁻, c-kit⁺ клеток КМ трансгенных самцов, меченных GFP, в сокращающуюся мышцу, граничащую с очагом экспериментального инфаркта, приводила в течение 9 дней к колонизации донорскими клетками половины инфарктной зоны [562]. В разрастаниях трансплантированных клеток выявлялись клетки с морфологией незрелых кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток и клеток гладких мышц. Jackson и др. [346] трансплантировали 2000 ГСК в КМ мышей с перевязанной венечной артерией и показали, что потомство трансплантированных клеток может образовать эндотелиальные клетки и кардиомиоциты. Авторы предположили, что образование эндотелия из очищенных ГСК отражает наличие тесной взаимосвязи эндотелиальных и кроветворных клеток с возможным существованием у взрослых животных общих «гемангиобластов» [153]. Kocher и др. [394] после введения клеток КМ в кровоток животных с поврежденным миокардом также наблюдали разрастания сосудов в миокарде. Во всех этих случаях у реципиентов отмечали улучшение функции сердца, связанное с приживлением трансплантированных клеток.

Дальнейшие наблюдения *in vitro* подтвердили пластичность региональных СК. Jiang и др. [358, 359], а затем Schwartz и др. [669] после длительного культивирования выделили из мезенхимальных клеток КМ человека и грызунов так называемые MAPC (multipotent adult progenitor cells; мультипотентные взрослые прогениторные клетки), которые можно было индуцировать к дифференцировке не только в клетки мезенхимальных линий, но также в эндотелий, нейроэктодерму (нейроны, астроциты и олигодендроциты) и энтодерму (гепатоциты). Причем фенотип трансдифференцированных клеток устанавливали не только по внешним признакам, но и подтверждали функцией новообразованных клеток.

Дальнейшие исследования показали, что в состоянии нормальной физиологической тканевой регенерации пластичность не является постоянной функцией региональных СК [231, 771]. Пластичность специфических (дефинитивных) тканей не проявляется в обычных условиях, когда СК находятся в привычном клеточном окружении, т. е. располагаются в своих нишах. Не обнаруживали пластичности у региональных СК, которые были трансплантированы животным, не подвергшимся облучению или иному тяжелому повреждающему воздействию [10]. Для индукции пластичности у этих клеток необходимо было повреждение организма и/или действие определенных стимулов. Под влиянием всей этой информации, дополненной сообщениями о развитии из единичных региональных СК тканей всех трех зародышевых листков [402], исследователи серьезно заинтересовались механизмами тканевой пластичности.

Термин «пластичность СК» интерпретируется в научной литературе без существенных расхождений. Одни исследователи определяют пластичность как способность тканеспецифических СК дифференцироваться в иные, чем в норме, типы клеток, т. е. приобретать свойства и разделять судьбу клеточных типов, отличающихся от клеток ткани, из которой эти СК произошли [11, 283, 765]. Другие исследователи трактуют пластичность как способность клеток «уравновешивать пролиферацию или самообновление с дифференцировкой во многие линии клеток» [27]. Также определяют пластичность как «способность СК из специфической ткани или органа в своей дифференцировке преодолевать линейные и тканевые барьеры и приобретать профиль экспрессии и функциональный фенотип, уникальные для клеток другой ткани» [4].

Verfaillie и др. [766] предложили несколько критериев, которые необходимо учитывать при использовании термина «пластичность» для характеристики функции СК. Пластичность СК должна быть подтверждена экспериментальной дифференцировкой единичных СК в специфические клетки, отличающиеся от клеток ткани, из которой произошла СК. При этом все зрелые клетки,

происходящие из предполагаемой СК, должны быть способны к осуществлению специфической функции как *in vitro*, так и *in vivo*. Разрастания *in vivo* СК, проявляющих пластичность, должны быть постоянными и надежными, а в эксперименте обнаруживаться как при наличии поврежденной ткани, так и без последних.

Как мы отмечали в главе 2, МСК и клетки стромы КМ также могут образовывать как *in vivo*, так и *in vitro* много типов тканей, таких как костная, хрящевая, жировая ткани, строма, поддерживающая миелопоэз. Многие исследователи определяют такую способность МСК и клеток стромы КМ также как пластичность. Но подобная пластичность характеризуется некоторыми отличительными особенностями. Она касается превращений в различные типы соединительной ткани: остеобластический, хондроцитарный, адипоцитарный, миелоидный и поддерживающий кроветворение. Эти превращения происходят в пределах родственных линий клеток, наследующих экспрессию определенных генов. Хондроциты, остеобласты, ретикулярные клетки и адипоциты происходят из клеток-предшественников, экспрессирующих маркер остеогенной направленности, т. е. неуклонно («ортодоксально») следующих одному направлению. Превращения в различные типы соединительной ткани, осуществляющиеся в пределах родственных линий клеток, обладающих наследуемой экспрессией генов, отличаются от дифференцировки клеток, происходящей с нарушением линейных барьеров и приводящей к появлению клеток других линий, приобретающих специфические маркеры и функции. Даже если в одном и другом случае мы имеем дело с одним явлением, то все равно это две разновидности этого явления, имеющие характерные отличительные признаки. Все проявления ортодоксальной дифференцировки мы предлагаем определять как конверсии и рассматривать отдельно от проявлений так называемой неортодоксальной дифференцировки, т. е. не в привычные ткани.

Повышенная противоречивость феномена пластичности региональных СК и необходимость освещения лежащих в основе ее механизмов требует уточнения терминологии. Прежде всего, это касается терминов «СК» и «пластичность», с которыми не советуют обращаться как «со сросшимися близнецами» [736], хотя во многих случаях связь этих терминов несомненно обнаруживается. Термин «пластичность» следует применять для обозначения такой дифференцировки или способности к ней, которые являются несвойственными для данной линии клеток. Так, ГСК образуют целый ряд кроветворных линий, но эта способность не представляет явление пластичности. Термин «пластичность» может быть применен в том случае, когда выявляется необычное дифференцировочное событие, когда судьба клетки неожиданно выходит за пределы органа или даже линии. В то же время поднимается вопрос, только ли СК присуща пластичность или пластичность — это свойство, которое может быть проявлено множеством клеток (может быть, даже всеми), если они окажутся в необычных условиях дифференцировки.

Частота, с которой пластичность СК проявляется, например, после трансплантации цельного КМ, колеблется, по данным разных авторов, в печени от 0,07 % до 50 %; в нервной ткани — от 0,2 % до 2,3 %; в скелетных мышцах — от 0,2 % до 12,5 %; в легких — от 1 % до 35 % [419, 504, 606]. На частоту этого явления оказывает влияние тип ткани и наличие ее повреждений, а также фенотипический состав и функциональное состояние введенных клеток. В некоторых случаях успех обеспечивает предварительное создание химеризма с первичным облучением хозяина; в других — общее облучение реципиента и вторичное повреждение ткани, принимающей введенные клетки [606].

Пластичность региональных СК изучена явно недостаточно. В большей части работ на животных, демонстрирующих пластичность региональных СК человека, использовали клетки, полученные из КМ, которые не подвергались тщательной очистке и могли содержать смесь клеток, а не только ГСК, МСК или эндотелиальные клетки-предшественники. В нескольких таких работах было показано, что после трансплантации КМ летально облученным мышам-реципиентам у последних обнаруживали, кроме клеток кроветворной линии, клетки мезодермальной линии донорского происхождения, хотя их уровень был обычно низкий и составлял всего несколько процентов от общего числа клеток. В некоторых исследованиях проводили обогащение вводи-

мого КМ кроветворными СК, используя маркеры клеточной поверхности [562] или функциональную характеристику этих клеток [674, 813]. После введения донорские клетки выявляли у облученных или иммунодепрессированных животных-реципиентов в скелетных мышцах [133, 170, 237, 286], эндотелии сосудов [230, 275, 674] и мышце сердца [555, 562]. В отдельных работах были получены данные, позволившие предполагать дифференцировку клеток КМ *in vivo* и *in vitro* в клетки с нейроэктодермальной и энтодермальной морфологией и фенотипом [400, 804], овальные клетки регенерирующей печени [374, 419, 564, 589], эпителиальные ткани, такие как кожа и легкие [402]. Из дермы грызунов и человека были выделены клетки, способные проявить кроветворный потенциал и восстановить КМ летально облученных животных, а также дифференцироваться в нейроэктодермальные (нейроны и клетки глии) и мезодермальные линии (адипоциты и гладкомышечные клетки) [421, 746].

В одной из самых ранних работ по изучению пластичности НСК было показано, что СК, происходящие из спинного мозга взрослых крыс, которые обычно не образуют нейроны, могут быть индуцированы к этому при введении в гиппокамп взрослого животного [685]. В другой работе было продемонстрировано, что клетки нейросфер, происходящих из единичных НСК, трансдифференцировались в клетки кроветворных линий [99]. Однако попытка повторить это наблюдение, применяя тот же протокол опыта, оказалась безуспешной. В то же время на химерах мышь — цыпленок было показано, что нейросферы могут содействовать росту печени, слизистой желудка и канальцев мезонефроса [158]. Другие исследователи после введения КМ взрослых мышей самцов летально облученным самкам нокаутных мышей PU.1 обнаружили, что до 4,6 % клеток ЦНС у реципиентов были позитивные на Y-хромосому и экспрессировали нейрональные маркеры [504].

На основании результатов многочисленных работ было предположено, что в КМ, а также, возможно, и в других органах и тканях, таких как головной мозг, жировая ткань, мышцы, печень, фолликулярная дерма кожи и др., содержатся региональные СК с полипотентной природой, родственные ЭСК. Но все же некоторые исследователи считают, что пока «нет убедительных доказательств того, что истинные плюрипотентные СК существуют в организме после рождения» [11]. Внести ясность в эту проблему можно только одним способом — интенсифицируя изучение региональных СК.

Между тем исследователи начали проявлять некоторую озабоченность при интерпретации уже имеющихся данных. Если потомками кроветворных клеток могут оказаться нейроны или эпителий кишечника, а производные нейроэктодермы обнаруживаются в скелетных мышцах или миокарде, не является ли это основанием для пересмотра генетической классификации тканей и основных положений эмбрионального гистогенеза [10]. Последние годы характеризуются тем, что происходит не только накопление данных, касающихся СК, а предпринимаются попытки изучения механизмов всех явлений, связанных с ними, и определения их места в биологических процессах. И часто внимание, сфокусированное на каком-либо наблюдении, приводит не только к изменению первоначальной оценки явления, но и к выявлению скрытых закономерностей. Хорошим примером в этом отношении могут быть данные, полученные в лаборатории Quesenberry [165, 166, 605, 606, 608], о которых уже упоминалось. Эти авторы, изучая рост *in vitro* СК и прогениторных колониеобразующих (CFU-c) клеток КМ мышей B6.SJL и BALB/c, установили, что данные клетки сосуществуют в неустойчивой непрерывности, а не в иерархической связи. Авторы показали, что в различных обратимых функциональных состояниях прогениторные клетки и СК могут быть на самом деле одними и теми же клетками, т. е. СК могут непрерывно изменять свой фенотип и свойства и быть прогениторами в одной фазе цикла и СК — в другой фазе. На основании этих наблюдений более резонно воспринимается предложение Blau и др. [102] рассматривать СК не как самостоятельную клеточную сущность, а предпочтительнее как клетку, выполняющую некоторые функции СК. Theise и Harris [736] также поднимают вопрос, является ли СК всегда СК и не могут ли другие клетки, не являющиеся стволовыми, быть мобилизованы и индуцированы к тому, чтобы вести себя подобно СК. Позже были получены достаточно убедитель-

тельные материалы, позволяющие в отношении нескольких типов дифференцированных клеток дать положительный ответ на этот вопрос.

В основе проявлений пластичности может лежать несколько механизмов: 1) трансдифференцировка (де- и редифференцировка) соматических клеток; 2) слияние донорских клеток с резидентными клетками в органе; 3) наличие в различных органах множественных тканеспецифических региональных СК или даже «истинных» плюрипотентных региональных СК. В настоящее время имеются данные в поддержку всех указанных механизмов. В связи с большим теоретическим и практическим значением проблемы пластичности попробуем подробнее проанализировать данные, касающиеся проявлений этого свойства.

Большая часть исследований пластичности региональных СК проведена на грызунах, меньшая — представляет наблюдения, случайно сделанные в клинике. Основной массив работ основывается на введении региональных СК в организм летально облученного или обработанного иммунодепрессантами препаратами животного и небольшое число работ выполнено на основании изучения пластичности региональных СК грызунов и человека *in vitro* или после введения их в бластоцисты животных. Опубликован также ряд работ о дифференцировке клеток кордовой крови и КМ человека в неповрежденных плодах овцы [47, 55, 56, 396]. В этих случаях в разрастаниях СК, названных авторами нерестриктированными соматическими СК (USSC; *unrestricted somatic stem cells*), выявляли как кроветворные, так и некроветворные клетки: кардиомиоциты, гепатоциты, клетки легких и др. Частота USSC в кордовой крови оценивалась в пределах 10–11 клеток на общее число клеток, выделенных из пуповины. По всем своим характеристикам USSC были очень близки к мультипотентным прогениторным клеткам взрослых (MAPC), длительно сохраняющимся в культуральных условиях без трансформации [606].

В опытах на животных затруднительно изучать последовательные изменения трансплантированных СК, а также проводить точный анализ механизмов этого процесса [10]. Приходится удивляться тому, что вопрос о пластичности региональных СК, неоднократно обсуждаемый в научной литературе и представляющий несомненный практический интерес для клинической медицины, явно недостаточно изучен в относительно легко выполняемых вариантах познавательного процесса. В доступной нам литературе мы обнаружили сравнительно мало работ по изучению судьбы региональных СК после введения их в бластоцисты мышей. В работе, относящейся к 1998 г., Geiger и др. [268], вводящие в бластоцисту очищенные ГСК взрослого человека, маркированные трансгенным локусом глобина, констатировали только небольшое образование кроветворных клеток с содержанием трансгена человека. В работах из одной лаборатории [157, 158] потомки НСК колонизировали в зародыше производные всех трех зародышевых листков. Liang и Bickenbach [454] обнаружили потомков СК эпидермиса в эпидермальных, мезенхимальных и нейральных тканях плода и взрослой химерной мыши, а Keene и др. [378] после трансплантации единичной МСК в бластоцист эмбриона мыши выявляли нейрональную дифференцировку и множественные включения мультипотентных взрослых прогениторных клеток. Jiang и др. [358] установили, что MAPC, также как МСК КМ, способны дифференцироваться в клетки, проявляющие свойства мезодермальных, нейроэктодермальных или эндодермальных линий. При введении MAPC в бластоцист мыши эти клетки способствовали образованию большинства тканей, если не всех. Химеризм на уровне 33 % и 80 % был отмечен у мышей, родившихся после введения в ранние бластоцисты (3,5 дня) соответственно одной или 10–12 MAPC. Отсутствие химеризма у некоторых мышей с микроинъектированными бластоцистами может быть связано с недостаточной гомогенностью клеточных суспензий перед введением или техническими проблемами. Но в положительных случаях химеризм выявляли не только у эмбрионов мышей, а также у животных в возрасте 6–20 недель.

С позиций экспериментальной эмбриологии результаты этих исследований следует считать парадоксальными, так как в развитие химерного зародыша могут включаться только клетки млекопитающих, находящиеся на самой ранней стадии развития (в отличие от всех разновидностей ЭСК) [10]. В случае подтверждения результатов этих работ надо будет признать, что при куль-

тивировании в определенной среде региональные СК могут приобрести свойства, сближающие их с плюрипотентными ЭСК [10]. Казалось бы, за этими выводами должен был последовать вал исследований, стремящихся установить истину, но пока активности работ в этом направлении мы не обнаруживаем.

Что касается работ по изучению пластичности региональных СК *in vitro*, то до сих пор наиболее частыми объектами таких исследований были клетки КМ и жировой ткани, а также МСК, НСК и клетки островков ПЖ. Как видим, большого разнообразия объектов не отмечается. К тому же исследователи, изучающие региональные СК жировой ткани, обращали внимание на сходство их с МСК. В связи с этим обсуждался даже вопрос, не являются ли эти клетки той частью популяции МСК, которая попадает в жировую ткань благодаря периферическому кровоснабжению и оседает там [846]. Такое предположение посчитали на основании некоторых данных сомнительным, однако не исключили, что региональные СК жировой ткани могут быть клональным вариантом циркулирующих МСК. В поддержку такого заключения приводили большое сходство генного профиля региональных СК жировой ткани с транскриптограммами МСК из стромы КМ. Но в то же время отмечали, что эти клетки не экспрессируют ряд белков, которые считаются молекулярными маркерами «стволовитости», такие как CD133, теломераза и др.

Региональные СК жировой ткани дифференцируются *in vitro* в липогенную, остеогенную, хондрогенную, миогенную и нейрогенную линии [373, 846, 847] и клетки эндотелия сосудов [596]. Решающим же обстоятельством, позволившим отнести эти клетки к региональным СК, явилось получение из одиночных таких клеток клонов, обладающих мультилинейной специфичностью [641, 846, 847].

Особый интерес вызывают клинические наблюдения. Brittan и Wright [120] сообщили о результатах исследования методом гибридизации *in situ* полиплоидии у женщин-реципиентов в клетках кожи, печени и эпителия слизистой желудка, образующихся из СК периферической крови мужчин-доноров. В этих клетках авторы установили наличие только одной X- и одной Y-хромосомы. Аналогично Okamoto и др. [555] не обнаружили у женщин — реципиентов КМ мужчин — признаков клеточного слияния, обеспечивающего разрастание и дифференцировку клеток КМ в эпителиальные клетки слизистой оболочки ЖКТ. Была отмечена длительная (в течение многих месяцев) пролиферация этих клеток и образование в конечном итоге до 13 % колоний, происходящих из донорского КМ, что иногда вызывало даже реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ). Конечно, определение полиплоидии методом гибридизации *in situ* сталкивается порой с трудностями, наименьшей из которых является невозможность визуализировать все хромосомы в срезах ограниченной толщины. Более надежный метод использовали Kleeberger и др. [Kleeberger, et al., 2002], которые исследовали химеризм в аллотрансплантатах печени, анализируя методом ПЦР высокополимерные повторы тетрауклеотидов псевдогенов, связанных с β -актином человека. Применяя микроиссечение лазером небольших участков гепатоцитов и клеток желчных протоков, авторы обнаружили, что почти во всех пробах проявлялся генотип как донора, так и реципиента, что предполагало их происхождение из внепеченочного источника. Но так как пробы содержали материал не из одной клетки, нельзя было исключить клеточное слияние.

Alison и др. [50] исследовали эпителиальные ткани матерей детей мужского пола. У женщин после родов иногда наблюдается обострение тиреоидита, обусловленное трансплацентарным переносом клеток плода, вызывающих у матери аллоиммунную реакцию, прежде рассматривающуюся как аутоиммунное заболевание [709]. У одной такой женщины щитовидная железа содержала кластеры полностью дифференцированных фолликулярных клеток, экспрессирующих одну X- и одну Y-хромосому. Предположили, что источником трансдифференцированных клеток был плод. Но фолликулярные клетки с генотипом XXXY не обнаруживались. В связи с этим авторы пришли к выводу, что клеточное слияние вряд ли лежит в основе этого феномена.

Некоторые публикации, в которых описывается пластичность региональных СК зрелых тканей, заслуживают серьезной критики [10]. Но прежде рассмотрим те уже названные механизмы, которые могут лежать в основе явных проявлений пластичности.

7.2. Трансдифференцировка клеток как основа пластичности

Наиболее полно все представления о пластичности реализуются в ядерном клонировании, в процессе которого соматическое ядро, трансплантированное в энуклеированную яйцеклетку, претерпевает эпигенетическое репрограммирование, приводящее к проявлению пластичности. В настоящее время уже не вызывает сомнений, что генетическая информация может быть репрограммирована и соматические клетки могут дедифференцироваться в мультипотентные клетки [801]. Сообщали, например, что прогениторные клетки олигодендроцитов из зрительного нерва при сохранении в бессывороточной среде низкой плотности приобретают характерные свойства НСК [808]. В другой работе было заключено, что клетки со специфичностью эпителия ПЖ могут редифференцироваться в клетки печеночного фенотипа, хотя функциональные свойства клеток такой печеночной линии не определяли [677]. Однако если признавать значение де- и редифференцировки в биологии региональных СК, тогда можно допустить возможность репрограммирования региональных СК и прогениторных клеток всякий раз, когда они выделяются из их обычного микроокружения и переводятся в другие ниши, в которых они могут принимать сигналы, активирующие новую генетическую программу, определяющую иную судьбу клетки [754, 765].

Дедифференцировка — процесс, лежащий в основе таких пока не полностью раскрытых проблем биологии, как регенерация, ядерное клонирование, формирование новых клеточных линий, карциногенез [274, 546, 800]. Дедифференцировка обычно связана с возвратом в клеточный цикл. Ее отличительной чертой является изменение данного дифференцированного статуса на состояние, подобное статусу СК, которой присуща мультипотентность [219, 546, 800]. Клеточная дедифференцировка как у растений, так и у животных характеризуется значительными изменениями генной экспрессии, так как происходит переключение клетки от программы, обеспечивающей специфическую функцию, к новой программе, направляющей клетку к возврату в клеточный цикл, де-(ре)дифференцировке или апоптозу. Редифференцировка заключается в превращении клетки дифференцированного типа в другой тип без прохождения через клеточный цикл [274]. Таким образом, в основе процесса клеточной дедифференцировки лежит способность клетки ремоделировать программу своей генной экспрессии. Так как данная программа реализуется той частью генома, которая подвергается транскрипции (эухроматин), в отличие от той, которая репрессирована (гетерохроматин), кажется, что для изменения судьбы клетки должен установиться новый баланс между эухроматином и гетерохроматином [274]. Значение структуры хроматина в переключении судьбы клетки подтверждается конверсией фибробластов мыши в новые мезенхимальные фенотипы (адипоциты, хондроциты, клетки скелетных мышц) при обработке 5-азациитидином [728]. Это нуклеотидное соединение после включения в ДНК снижает метилирование, что, в свою очередь, влияет на структуру хроматина и генную экспрессию [364]. Динамическое изменение структуры хроматина может прямо быть вызвано модификацией ДНК (например, метилированием), а также посттрансляционными изменениями аминокислотных концов гистонов [274]. Внутри этих структур содержатся специфические аминокислоты (аргинин, лизин и серин), которые подвергаются многочисленным посттрансляционным модификациям, включая ацетилирование, метилирование и фосфорилирование, создавая таким образом «код» для мобилизации белковых комплексов, влияющих на структуру и функцию хроматина [277, 356]. У многих дедифференцированных эукариотических клеток, также как у протопластов растений (растительные клетки, лишённые клеточных стенок), выявляли реорганизацию хроматина. При этом часто перед реактивацией синтеза ДНК проявлялись две отчетливые фазы деконденсации хроматина [101]. Ранняя фаза представляет ядерное репрограммирование, приводящее к установлению мультипотентности, тогда как вторая фаза связана с обретением клеткой новой судьбы, а именно повторным входением в клеточный цикл. Таким образом, реорганизация хроматина является фундаментальной основой как клеточной дедифференцировки, так и возврата в клеточный цикл, создающим условия для перепрограммирования генной экспрессии (рис. 7.1).

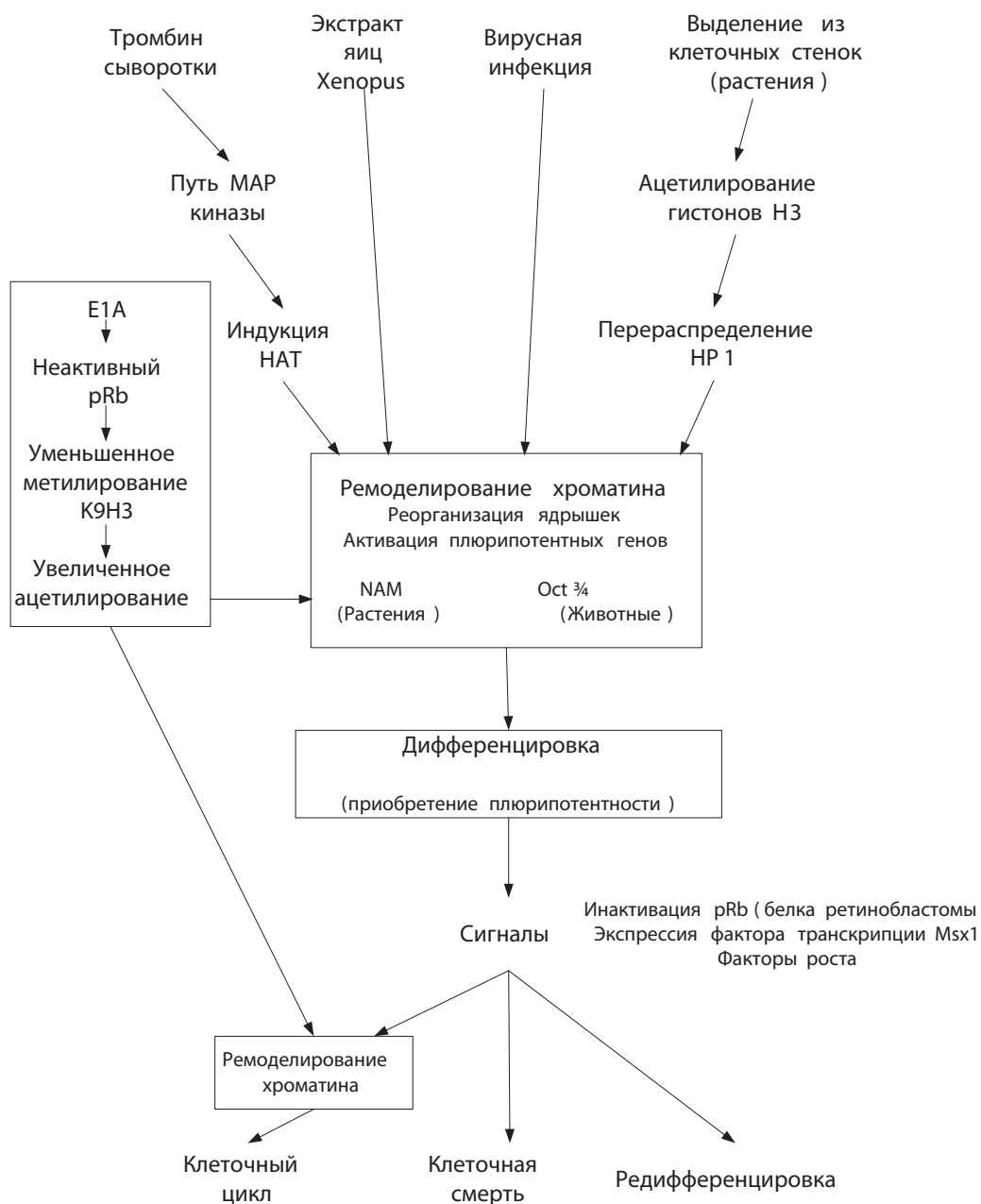


Рис. 7.1. Предполагаемая модель дедифференцировки клетки

По Grafi [274]. NAT — гистоновая ацетилтрансфераза; HP1 — белок гетерохроматина 1. Остальные пояснения в тексте.

Такая модель предполагает, что клеточная дедифференцировка, т. е. приобретение мультипотентности, запускается ремоделированием хроматина, часто связанным с реорганизацией ядерного домена. Ремоделирование хроматина приводит к активации мультипотентных генов, таких как *NAM* у растений и *Oct3/4* у животных, посредством чего устанавливается мультипотентность.

Подобное ремоделирование может быть запущено разными стимулами, такими как протеолиз тромбина, вирусное заражение, удаление у растений клеточных стенок, инактивация белка ретинобластомы (pRb) — мастера гена, регулирующего клеточный цикл, дифференцировку и апоптоз. Предполагается, что инактивация pRb, достигаемая фосфорилированием или обработкой онкобелком E1A, сверхэкспрессия фактора транскрипции Msx1, а также различные ростовые факторы, действующие после установления плюрипотентности, могут изменить судьбу клетки, т. е. привести ее к редифференцировке, повторному входу в клеточный цикл или смерти [274].

Проникновение в молекулярные механизмы, лежащие в основе ядерного репрограммирования во время процесса клонирования, может помочь нам лучше понять феномен пластичности региональных СК и разработать в будущем индукцию переключения линии даже без пересадки ядра. Основу исследований такого направления могут составить работы по получению гибридов соматических клеток и ЭСК. Tada и др. [719, 720] разработали экспериментальную систему, воспроизводящую *in vitro* ядерное репрограммирование дифференцированных соматических клеток (timoцитов взрослых самок трансгенных мышей) при слиянии их с ЭСК. Из полученных 31 гибридных клонов в 17 (55 %) была обнаружена перестройка специфических V-(D)-J участков ДНК рецепторов Т-клеток и генов иммуноглобулинов, являющаяся признаком дифференцировки тимоцитов в лимфоидные клетки [28].

У гибридов ЭСК и тимоцитов неактивные Х-хромосомы, происходящие из тимоцитов самок, приобретали некоторые свойства активных Х-хромосом. Активация обеих Х-хромосом является показателем ядерного репрограммирования. В гибридных клетках в течение 48 ч. после слияния выявляли реактивацию трансгена Oct4-GFP, который в тимоцитах обычно репрессирован. После трансплантации в нормальные диплоидные бластоцисты гибридных клеток ЭСК-тимоцит их потомки обнаруживались в тканях всех трех зародышевых листков. Было заключено, что ЭСК обладают способностью изменять некоторые свойства эпигенотипа соматических клеток на свойства ЭСК, т. е. вызывают их трансдифференцировку.

Под трансдифференцировкой понимают процесс изменения состояния дифференцировки клеток, которые уже были специализированы или запрограммированы в определенную линию [Okada T. S., 199]. Одним из первых примеров такого явления была описанная у тритонов конверсия пигментированных эпителиальных клеток радужной оболочки глаза в клетки хрусталика во время регенерации хрусталика [121]. При нормальном развитии млекопитающих трансдифференцировку можно наблюдать, например, в пищеводе, в котором гладкомышечные клетки вдруг начинают образовывать миоциты скелетных мышц [577]. Как уже говорилось, в последние годы появилось много работ, описывающих переключение направления дифференцировки клеток, происходящих из КМ, после трансплантации их человеку или грызунам. Но появление большого числа данных о разностороннем потенциале трансплантированных СК дает основание подумать, не может ли этот потенциал проявляться и при нормальном развитии?

7.2.1. Методология определения проявлений трансдифференцировки

В связи с тем, что проявления трансдифференцировки часто малозаметны, для выявления ее необходимо использование определенной методологии. Положительное заключение о трансдифференцировке обычно основывается на трансплантации полностью охарактеризованной, тщательно очищенной клеточной популяции и определении химеризма у реципиентов прежде всего в месте первичной локализации пересаженных клеток, подвергающихся экспансии. Полнота доказательства трансдифференцировки будет зависеть как от точной характеристики донорских клеток, так и от надежности и достаточности подтверждения их дифференцировки и приживания в организме реципиента.

Для распознавания клеток донорского и реципиентного происхождения применяются как естественно отличающиеся маркерные системы, использующие несовместимость партнеров химеризма по полу и аллельным вариантам клеток, так и искусственно созданные системы, такие как трансгенные маркеры. Также широкое применение получило определение маркеров

Y-хромосомы. По распространенному мнению, гибридизация *in situ* с определением последовательности нуклеотидов Y-хромосомы является теоретически идеальным методом, так как окрашивание ядра можно комбинировать с иммунофенотипированием, позволяющим точно определять идентичность клеток [806].

Маркерные системы, основанные на применении аллельных различий клеток, способствовали выполнению многих значимых исследований на мышах. В числе этих систем использование полиморфизма гемоглобина, глюкозофосфат изомеразы и генов *Ly5* (определяющих антигенные различия лейкоцитов мышей разных линий, экспрессирующих CD45). Хотя большинство экспериментальных трансплантаций, анализирующих пластичность СК, выполнено с сингенным подбором участников, чтобы свести к минимуму возможное воздействие иммунных реакций, в некоторых исследованиях использовали линейную несовместимость по антигенам МНС, чтобы проследить судьбу трансплантированных популяций СК с помощью специфических антисывороток. Так, Kennedy и Weissman [380], применяя антилейкоцитарные сыворотки, доказали включение клеток как реципиента, так и донора в интиму артерий больного после пересадки сердца. Vjongsop и др. [99], используя проточную цитофлуориметрию и различие в антигенах МНС между клетками донора и реципиента, проследили судьбу потомков НСК в периферической крови.

Кроме применения естественно отличающихся генно- и фенотипических маркерных систем, для изучения трансдифференцировки используются также искусственно созданные различия донора и реципиента, основанные на маркировании генов. У трансгенных животных часто применяются система LacZ и гены зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein; GFP); первая — вследствие легкости проведения ферментной цветной реакции с X-gal [251], а вторые — вследствие возможности использования прямой флуоресцентной микроскопии [554]. Значительное улучшение маркерной системы LacZ может быть достигнуто при ее ядерной локализации и контроле трансгенной экспрессии с помощью тканеспецифических промоторов. Например, в работе Ferrari и др. [237] определение активности гена-репортера не только выявило происхождение пересаженных клеток, но одновременно установило их транскрипционную активность в отношении миогенной дифференцировки. GFP является, вероятно, самым простым и надежным из всех маркеров, но следует отметить, что некоторые типы клеток показывают высокую аутофлуоресценцию с тем же профилем эмиссии, как у GFP. В связи с этим данная маркерная система должна применяться с тщательным контролем. Хотя введение генов-репортеров в зародышевые клетки животных обеспечило ценную методику маркирования опытной популяции, применимость такого подхода к клеткам человека будет оправдана только при наличии эффективной стратегии генетического маркирования соматических СК. Широко обсуждается возможность применения ретровирусного маркирования клеток человека, особенно при получении клонов трансплантата. Ошибки, которые могут иметь место при определении донорских клеток с использованием той или иной маркирующей системы, анализируются в обзоре [Vulliamy T., et al., 2001].

После трансплантации клеток КМ летально облученным реципиентам генетические маркеры донорских клеток (GFP или Y-хромосома) обнаруживались в различных тканях реципиентов за пределами кроветворной системы [272]. В других работах, описывающих результаты трансплантации облученным животным единичных ГСК или некоторого числа этих клеток, полученных путем клонирования из одной клетки, маркеры последних выявляли в целом ряде органов [133, 170, 275, 402, 771]. В частности, ГСК, трансплантированные в КМ облученных животных, принимали участие в восстановлении сосудов и кардиомиоцитов при экспериментальном инфаркте у мышей [345]. Однако лишь 0,02 % кардиомиоцитов содержали клеточный маркер LacZ, принадлежащий донорским кроветворным клеткам, хотя в КМ реципиентов до 90 % клеток были донорского происхождения. Вряд ли столь незначительное число трансформированных клеток могло повлиять на функцию миокарда [10]. Высоким методическим уровнем отличалась работа Ferrari и др. [237], о которой уже говорилось. Обнаружение среди мышечных волокон реципиентов ядер, экспрессирующих ген *Lac Z*, убедительно доказывало участие клеток КМ в миогенезе. Но часто-

та этой трансформации, выявляемой после некроза скелетных мышц под действием яда кобры, была очень низкой (от 0,1 до 0,01 %). В другой работе при непосредственном введении ГСК в поврежденный миокард получали более существенные результаты. Значительное количество маркированных клеток располагалось вблизи места инъекции, причем функциональные способности миокарда заметно улучшались [Park S., 1993]. Как объясняли сторонники гипотезы трансдифференцировки, региональные СК могут дифференцироваться вне ткани своего происхождения, реагируя на новое микроокружение без изменения своей генетической принадлежности. Таким образом, эти представления ставят под сомнение устоявшееся мнение о неизменности судьбы клетки в биологии развития млекопитающих. Такое отступление от основных постулатов эмбриологии и гистологии привело к критическому восприятию результатов новых исследований.

Какое-то время считали, что убедительное доказательство трансдифференцировки предоставляет работа Lagasse и др. [419]. Она была проведена на самках трансгенных нокаутных мышей ФАН с наследственной тирозинемией, вызванной делецией гена ФАН (фумарилацетоацетат гидролазы). Эти мыши обычно погибают от прогрессирующей недостаточности печени и повреждения канальцев почек, обусловленных накоплением метаболита фумарилацетоацетата и его предшественника малеилацетоацетата. Самкам ФАН трансплантировали 10^6 клеток нефракционированного КМ или КМ, обогащенного ГСК, из самцов мышей ROSA 26, все клетки которых убиквитарно экспрессируют ген *LacZ*, выделенный из *E.Coli*. Донорские клетки КМ или выделенные из него ГСК дифференцировались в клетки с фенотипической характеристикой гепатоцитов. Последние, проявляя функциональные свойства, спасали мышей ФАН от смерти, обеспечивая потребность животных в недостающем генопродукте. Гепатоциты, экспрессирующие маркеры донорских клеток, не были диффузно рассеяны по всей печени мышей-реципиентов, а локализовались в виде отчетливых, но очень малочисленных узелков. Было заключено, что такой характер разрастания отражает редкую клональную экспансию донорских клеток под сильным и стойким влиянием положительной селекции, которая достигалась отменой приема циклогексанэдиона — препарата, блокирующего у мышей с недостатком ФАН расщепление тирозина до фумарилацетоацетата.

7.2.2. Механизмы трансдифференцировки

Трансдифференцировка входит в более широкий класс клеточных трансформаций, называемых метаплазиями, при которых также может отмечаться превращение СК одного типа в клетки другого типа. Например, переключение СК желудка в кишечные СК может вызвать появление бляшек эпителия кишечника в желудке [Fiegel и др., 2003]. Другими примерами могут быть костная метаплазия в скелетной мышце, заключающаяся в образовании зрелой кости в мышечной ткани после травмы; или развитие чешуйчатой метаплазии клеток респираторной линии в легких курильщиков. У патологов некоторые другие процессы, приводящие к замещению одного клеточного типа другим, могут также называться «метаплазиями», но они представляют совсем другой биологический феномен.

В ряде случаев трансдифференцировка может сопровождаться клеточным делением, тогда как в других случаях она развивается без деления. Предполагают, что подключение дедифференцировки к трансдифференцировке зависит от скорости развития конверсии. При трансдифференцировке происходит выключение одного набора генов и включение новых генов. Если эти процессы развиваются быстро, продукты первого набора генов могут сохраняться при появлении продуктов нового набора. В этом случае дедифференцировки не должно быть, и какое-то время будет наблюдаться одновременное наличие маркеров каждого клеточного типа. При замедленной конверсии клеток между первичной и конечной стадией может отмечаться состояние дедифференцировки [176].

Некоторые исследователи [166, 760, 761] задумались над вопросом, не флуктуирует ли трансдифференцировка с изменением фазы клеточного цикла? По данным этих авторов, которые мы уже упоминали, СК в какой-то временной точке клеточного цикла может не проявлять себя

как СК, тогда как в другой точке цикла — действовать как СК. Но можно также подозревать, что в какой-то момент часть клеток с потенциалом СК окажется просто недоступной для определения [Ziegler и др., 1999].

Eguchi и Kodama [223] установили два главных критерия трансдифференцировки: 1) выявление двух дифференцированных состояний клеток, подтвержденных морфологическими и молекулярными характеристиками; 2) обнаружение, обычно с применением тканевой культуры, линейных взаимоотношений между двумя типами клеток. Хорошо изученным примером трансдифференцировки у млекопитающих является превращение клеток ПЖ в гепатоциты. Rao и др. [615–619], применяя методику, заключающуюся в скармливании крысам пищи с недостатком меди, обнаружили появление гепатоцитов в ПЖ. Эктопические гепатоциты экспрессировали белки печени (альбумин) и реагировали на пероксисомальные пролифераторы. Затем было продемонстрировано, что в этой системе происходит обогащение печени факторами транскрипции LETFs (C/EBP α , β , δ) [174, 175], но в опытах на животных было трудно установить молекулярную основу переключения и выделить тип прогениторных клеток. Позже Shen и др. [677] сообщили, что трансдифференцировка клеток ПЖ может быть вызвана *in vitro* добавлением в культуральную среду синтетического глюкокортикоида дексаметазона. В гепатоциты переключаются клетки с экзокринным фенотипом; и переключение никогда не сопровождается клеточным делением. При этом было установлено, что факторы транскрипции LETF C/EBP β необходимы для индукции трансдифференцировки клеток ПЖ в гепатоциты и последующего сохранения панкреатических гепатоцитов, экспрессирующих печеночные маркеры (Г6Ф, альбумин, трансферрин, транстиретин) и обладающих печеночной морфологией, включающей даже наличие желчных канальцев. В этой работе была также установлена молекулярная основа трансдифференцировки. Экспрессия факторов транскрипции C/EBP β является одной из самых ранних реакций клеток ПЖ на обработку дексаметазоном. При трансфекции C/EBP β в клетки ПЖ наблюдали трансдифференцировку последних в гепатоциты, которую можно было предупредить или подавить печеночным ингибирующим белком, представляющим собой неактивную форму C/EBP β .

Однако динамика всех процессов, обеспечивающих переключение судьбы дифференцированных клеток млекопитающих, неизвестна. Печень и ПЖ во время эмбрионального развития возникают из соседних регионов энтодермы передней части пищеварительного тракта. Трансдифференцировка может отражать эти тесные взаимоотношения во время развития, хотя еще остается выяснить, является ли C/EBP β ключевым фактором изменения судьбы этих клеток во время нормального развития [176].

В качестве другого объекта исследований при изучении конверсии клеток часто используют миотрубочки (myotube), считающиеся конечными дифференцированными клетками [219, 749]. В зависимости от характера принимаемого сигнала миотрубочки могут быть индуцированы либо к возврату в клеточный цикл и пролиферации, либо к апоптозу или прямой трансдифференцировке в другой тип клеток [545, 749]. Grafi [274], основываясь на исследованиях, проведенных на растительных и животных клетках, предложил модель, представляющую клеточную дедифференцировку на основе изменения структуры хроматина. Предполагается, что как миотрубочки, так и любая другая клетка, для изменения своей судьбы должны вначале пройти через подготовительную стадию, обеспечивающую мультипотентность. Ремоделирование хроматина, приводящее к мультипотентности, может быть вызвано рядом причин, среди которых активность тромбина в сыворотке, вирусная инфекция и действие различных ростовых факторов. Переключение судьбы клетки может быть вызвано также инактивацией белка ретинобластомы (pRb) — главного регулятора клеточного цикла, дифференцировки и апоптоза [Herwig S. и др., 1997], и сверхэкспрессией *Msx1* [545], но только после того, как будет достигнуто состояние мультипотентности. Аналогичным образом, миотрубочки, экспрессирующие высокое содержание онкогена SV40 Т антигена, с помощью сыворотки, обеспечивающей проявление «истинной» дедифференцировки, могут быть индуцированы к возврату в клеточный цикл, апоптозу или образованию гигантских или «распыленных» ядер [Endo & Nadal-Ginard, 1998].

Известной моделью трансдифференцировки являются миобласты линии G8, спонтанно дифференцирующиеся в миотрубочки при культивировании в среде с ФТС. В сложной сети миогенных регуляторных факторов решающее значение принадлежит факторам транскрипции MyoD и Myf5 [Okada TS., et al., 1991]. Эктопическая сверхэкспрессия MyoD в фибробластах C3H10T1/2 оказалась достаточной для конверсии этих клеток в стабильные миобласты [180], тогда как при не проявляющейся активности MyoD отмечали подавление миогенной дифференцировки [468]. По данным Odelberg и др. [545], при эктопической экспрессии гена *Mx1* гомеобокса в миотрубочках C2C12 наблюдалось снижение уровней экспрессии миогенных регуляторных факторов, включая MyoD. Это снижение вызывало дезинтеграцию миотрубочек в моноклеарные клетки. При экспрессии в миобластах G8 факторов транскрипции C/EBP β и PPAR γ наблюдали подавление мышечно-специфических факторов транскрипции (MyoD, MRF4, Myf-5, миогенин) [330]. При стимуляции миобластов G8, экспрессирующих C/EBP α и PPAR γ , гормональной смесью (дексаметазон, синтетический лейкотриен и инсулин) выявили трансдифференцировку этих клеток в адипоциты. На основании необходимости смеси гормонов для индукции конверсии авторы предполагают, что, хотя C/EBP α и PPAR γ могут переключать мышечный фенотип, другие факторы также необходимы для включения липоцитарной программы [330]. При заражении миобластов ретровирусом, несущим ген *Wnt-1*, выявляли подавление процесса трансдифференцировки [648]. Эти изящные опыты по дедифференцировке/редифференцировке внутри мезенхимальной системы свидетельствуют о высоком потенциале, который управляемым воздействием на процесс дифференцировки может быть использован в будущем при клеточной терапии.

Кроме вышеупомянутых примеров переключения типов клеток, описано большое количество наблюдений трансдифференцировки, при которых не так очевидна взаимосвязь в развитии. Особенный интерес представляют клинические данные. Allison и др. [49] сообщили, что в печени женщин, получивших трансплантат КМ мужчины, были обнаружены гепатоциты, экспрессирующие Y-хромосому. С другой стороны, мужчины, получившие трансплантат печени от женщин-доноров, также содержали гепатоциты, экспрессирующие Y-хромосому [Tomita и др., 1999]. Оба эти наблюдения предполагают наличие внепеченочного источника гепатоцитов. На других работах, выявляющих пластичность региональных СК млекопитающих, мы уже останавливались.

При обсуждении возможных механизмов трансдифференцировки две характеристики, прежде всего, заслуживают внимания: факторы окружения, которые могут управлять этим переключением, и врожденные свойства СК, которые допускают реакцию на эти сигналы. По мнению Theise и Harris [736], убедительные примеры изменения дифференцировки с нарушением границ линии или органа продемонстрированы *in vivo* и *ex vivo* и вызываются действием местного микроокружения, обеспечивающего изменение генной экспрессии [156, 374].

Влияние макроокружения в динамике этих процессов ограничивается ролью гуморальных факторов, например, действием HGF, находящегося в кровотоке, при восстановлении ткани печени [515] или ролью G-CSF при мобилизации ГСК. Однако гуморальные факторы не обеспечивают специфичности ткани. Поэтому большое значение имеет микроокружение, посредством которого регенерирующая ткань осуществляет регуляторную функцию на циркулирующие или резидентные СК. Для этого есть множество путей: гуморальные факторы, прямые гомо- и гетеротипические клеточные контакты, возможности экстраклеточного матрикса. В имеющейся литературе представлено большое число экспериментальных данных о влиянии компонентов ниши СК на дифференцировку региональных СК, особенно тщательно изученное в отношении ГСК и клеток стромы КМ [156]. Однако пока нет данных о взаимодействии интродуцируемых (привнесенных извне) региональных СК с приютившими их тканевыми нишами. Между тем, характер взаимодействующих отношений, устанавливающийся в тканевой нише региональной СК, должен иметь большое значение при возможном клиническом применении этих клеток, так как замещающая способность региональных СК будет зависеть от подключения к этому процессу соответствующих ниш. На основании данных хоуминга и разрастания КСК в КМ пред-

полагается равная конкуренция региональных СК донора и реципиента [Huss R. и др., 1998]. Но возможно, что в других тканях, представляющих более легкодоступное пространство для приживления трансплантированных клеток, это взаимоотношение будет другим. Пока в большинстве работ, описывающих регенерацию ткани из неавтохтонных популяций СК у взрослых, подчеркивается зависимость кондиционирования микроокружения от тканевого повреждения. Таким образом, в первую очередь, вероятно, должно быть изучено отличие детерминант ниш региональных СК в нормальной и поврежденной ткани.

В этом отношении модельным органом может быть взята печень. Дифференцированные клетки печени сохраняют интенсивную пролиферативную способность, достаточную для поддержания физиологического оборота клеток и регенерации после сублетального повреждения. Однако в условиях нарушения жизнеспособности гепатоцитов, например, при хронической интоксикации, альтернативные линии клеток (овальные клетки, клетки ПЖ, кроветворные клетки-предшественники и др.) могут взять на себя дифференцировку в гепатоциты и обеспечение функции печени. Очаг поражения паренхимы печени может заполняться потомством региональных СК из нескольких различных источников. Факторы микроокружения, управляющие этим процессом, пока неизвестны, но они явно могут взаимодействовать с врожденными свойствами различных популяций СК в однонаправленной (т.е. гепатоцеллюлярной) системе, восстанавливающей структуру и функцию органа.

Для того, чтобы прореагировать на сигналы микроокружения, региональная СК должна экспрессировать рецепторы и/или сигнальные молекулы, которые могут быть такие же, как у клеток ниши. В связи с тем, что теперь стало больше известно о генах, экспрессируемых в СК, есть возможность получить сведения о тех из них, которые общие у различных популяций региональных СК, и которые, возможно, вовлекаются в пластичность и/или трансдифференцировку региональных СК [591, 731]. Shen и Slack [677] сообщили о решающем значении для трансдифференцировки клеток ПЖ в гепатоциты регулирующего транскрипцию C/EBP β (белка β , связывающего ССАТ/энхансер). По данным этих авторов, трансфекция C/EBP β была достаточна для индукции трансдифференцировки из фенотипа ПЖ в печеночный фенотип, тогда как чрезмерная экспрессия изоформы C/EBP β приводила к отмене этого процесса.

Другими объектами, в которых могут действовать механизмы, вовлекающиеся в дифференцировку, дедифференцировку и трансдифференцировку, являются ткани, происходящие из МСК: кости, хрящи, мышцы, клетки стромы КМ, сухожилия, адипоциты. В этих тканях, также как в кровеобразующей и печеночной системах, были выявлены факторы транскрипции, действующие в качестве временных регуляторов [132; Torres-Padilla и др., 2007]. Успешное выяснение всех вопросов, связанных с трансдифференцировкой региональных СК, возможно, смогут обеспечить в первую очередь работы, применяющие трансплантацию единичных клеток и использующие точные методы генетического анализа их потомков [Zhang и др., 2002].

7.3. Слияние клеток как основа пластичности

В биологии слияние клеток не относится к редким явлениям. Слияние яйцеклетки со спермием инициирует развитие позвоночных. И у взрослых животных слияние клетки с клеткой легко происходит при образовании из миобластов многоядерных скелетных мышечных волокон и остеокластов из моноцитов/макрофагов [61, 768].

Патофизиологическое слияние лежит в основе образования гранулематозной ткани при реакции на воспаление, вызванное заражением или внедрением чужеродных частиц (например, гигантские клетки Лангханса при первичном туберкулезе). Оно также опосредует внедрение вирусов в клетки-мишени с образованием зараженных лимфоцитарных синцитиев [61]. Выявление многоядерных клеток при пневмонии, вызванной вирусом Сендай, привело Harris H. к идее использования экспериментального слияния клеток *in vitro* для изучения регуляции нормальной и опухолевой тканеспецифической генной экспрессии [299] и, вероятно, содействовало развитию гибридной технологии для получения моноклональных антител [Kohler & Milstein, 1975].

Хотя возможность слияния клеток для инициации феномена пластичности теоретически не исключается, и слияние клеток взрослого организма или региональных СК с ЭСК и другими типами клеток описано в ряде работ последнего времени [358, 669, 720, 762], линейное переключение, наблюдаемое в этих исследованиях, было очень редким ($1/10^5$ — $1/10^6$). Предполагают необходимость значительных селективных усилий для успешного разрастания клеток после слияния, даже в условиях *in vitro* [730, 824]. Подобный же механизм может действовать *in vivo*, например, при острой недостаточности органа или гибели клеток в тканях, обычно хорошо переносящих тетраплоидию, таких как мышцы, гепатоциты, клетки Пуркинье и другие [765].

О том, что слияние клеток может изменить их судьбу, известно еще из работ по получению гетерокарионов [103, 104]. Например, при слиянии миобластов с фибробластами у последних обнаруживается экспрессия мышечных белков. Это показывает, что в цитоплазме миобластов содержатся факторы, которые индуцируют специфическую мышечную дифференцировку в немuscularных клетках. Спонтанное слияние клеток часто выявляли в культурах макрофагов и моноцитов, образующих многоядерные гигантские клетки [Falzoni и др., 1995; 575, 768]. Образование таких клеток повышалось под влиянием различных цитокинов [228]. Было показано, что трансплантированные раковые клетки могут сливаться с клетками реципиента *in vivo* [797], причем в некоторых случаях с клетками кроветворного происхождения [798]. На мышах было продемонстрировано образование функционирующих гепатоцитов путем слияния клеток КМ и печени [762, 783]. Также было установлено, что НСК при культивировании *in vitro* с ЭСК или введении *in vivo* в бластоцисту могут дифференцироваться, по всей вероятности, в любой тип клеток [157]. Это показывает, что экстраклеточный фактор (или факторы) бластоцисты и ЭСК или молекулярные посредники межклеточного взаимодействия НСК с ЭСК могут обеспечить репрограммирование клеток взрослого организма в гибридные клетки, обладающие плюрипотентными свойствами. Для объяснения наблюдаемого явления содействия трансплантируемых клеток КМ или ГСК различным взрослым тканям была предложена гипотеза спонтанного слияния клеток *in vivo* [730, 824]. На нескольких экспериментальных моделях было показано, что ГСК могут сливаться с соматическими клетками, и происходящие от такого слияния гибриды приобретают маркеры обеих родительских клеток. Кроме ГСК в КМ были обнаружены коммитированные в специфические линии гепатоциты-макрофаги и зрелые макрофаги, из которых получали путем слияния целые популяции [132]. В двух работах, использующих систему Lagasse и др. [419], казалось бы, являющуюся наилучшим доказательством трансдифференцировки, было убедительно продемонстрировано, что новые гепатоциты образуются путем слияния клеток КМ донора и клеток реципиента [762, 783], а не из ГСК, подвергшихся трансдифференцировке, и не из печеночных СК, сохранившихся в КМ. Спонтанное клеточное слияние объясняет неожиданное переключение судьбы клеток у мышей с недостатком FAN, у которых отмечается сильное селективное давление на FAN-позитивные клетки.

Единственная популяция КМ, способная содействовать регенерации печени, была та, которая имела фенотип ГСК, а именно экспрессию $c\text{-kit}^{\text{high}}$, Thy^{low} , Sca1^+ , $\text{Lin}^{-/\text{low}}$. Восстановление печени сопровождалось долговременным разрастанием кроветворных клеток. Облученные мыши выживали после введения всего лишь 50 очищенных ГСК КМ. Но так как в популяции, полученной проточным сортированием, всегда оставалось некоторое число посторонних клеток, точное доказательство мультипотентности ГСК могла обеспечить только демонстрация, что единичная ГСК способна не только восстановить гемопоэз, но и образовать клетки нового типа, такие как гепатоциты или кардиомиоциты.

Terada и др. [730] выделили гибридные гипердиплоидные клетки со свойствами ЭСК из смеси клеток КМ самок трансгенных мышей, экспрессирующих гены GFP и проявляющих резистентность к пуромицину, и ЭСК нормальных сингенных самцов. Для поддержания роста кроветворных клеток в первую неделю в культуральную среду добавляли IL-3 и LIF. Спустя 7 дней в культуру вносили пуромицин для умерщвления ЭСК. В течение последующих 6 месяцев на-

блюдали рост большого числа GFP-позитивных клонов, происходящих из КМ самок, но морфологически подобных ЭСК (рост в виде плоских колоний с плотным соединением клеток). Эти клетки, после удаления из среды LIF, культивировались *in vitro* в висячих каплях. На 3-й день гибридные клетки образовывали плавающие сферы (ЭТ), которые вначале сохраняли в суспензионной культуре, а через 3 дня переносили в лунки планшета. После того, как сферы прикреплялись к пластику, наблюдали дифференцировку гибридных клеток в клетки с различной морфологией, включая сокращающиеся кардиомиоциты (15-й день). В начальные периоды культивирования в гибридных клетках выявляли высокую экспрессию маркеров недифференцированных ЭСК: *Oct 3/4* и *UTF1* [539, 675], которая снижалась по мере дифференцировки клеток. Напротив, после удаления LIF отмечали индукцию генов, свидетельствующих о мезодермальной, эндодермальной и эктодермальной дифференцировке. При культивировании гибридных клеток на стромальных клетках РА6 выявляли их преимущественную дифференцировку в нейроноподобные клетки, экспрессирующие тирозиновую гидроксилазу. Первоначально предполагали, что происходящие от донора клетки КМ дифференцируются в ЭСК, но при генетическом анализе гибридных клеток всех 13 полученных клонов установили, что содержание ДНК в этих клетках было выше диплоидного: в 11 клонах обнаружили тетраплоидию, а в 2-х оставшихся — гексаплоидию. Авторы заключили, что клетки КМ донора (вряд ли тканеккомитированные СК, скорее всего — макрофаги, моноциты или их предшественники) могут *in vivo* спонтанно сливаться с соматическими клетками реципиента и постепенно приобретать фенотип этих клеток. Частота спонтанного слияния клеток в этой работе была очень низкая (2–11 клонов на 10^6 клеток КМ), однако слившиеся клетки могли сразу стать доминантной популяцией, получив некоторые преимущества в выживании и росте над родительскими клетками за счет добавления дефицитных генов. Оставалось все же невыясненным, будет ли клеточное слияние отмечаться в других моделях, особенно при отсутствии выраженного селективного давления.

Очень сходное с работой Terada и др. исследование провели Ying и др. [824]. Эти авторы получили гибридные тетраплоидные клетки из смеси НСК, полученных из нейросфер трансгенных мышей самок, резистентных к пуромицину, и ЭСК сингенных мышей самцов, резистентных к гиргоницину. НСК содержали маркерные гены GFP или LacZ, а ЭСК отличались чувствительностью к пуромицину. После совместного культивирования НСК и ЭСК в культуральную среду вносили пуромицин для умерщвления ЭСК. Спустя 2–4 недели наблюдали появление в культуре клеток, которые были резистентны к гиргоницину (маркер ЭСК), но экспрессировали GFP (маркер НСК). У гибридных клеток, морфология которых соответствовала ЭСК, половина тетраплоидного набора состояла из хромосом, характерных для самцов, а другая часть набора состояла из хромосом, характерных для нейтральных клеток. На основании обнаружения как молекулярных, так и хромосомных маркеров было заключено, что появившиеся в культуре полипотентные клетки образовались не в результате трансдифференцировки нейтральных клеток, а вследствие спонтанного слияния (гибридизации) нейтральных клеток и ЭСК. В связи с доминированием в гибридных клетках свойств ЭСК при введении в бластоцисты гибридные клетки колонизировали зародыши и обнаруживались позднее в печени взрослых химерных мышей.

Данные исследований Terada и др. и Ying и др. согласуются с заключениями работ Vassilopoulos и др. [762, 783]. После трансплантации клеток КМ беспородных мышей самцов летально облученным самкам трансгенных мышей FAN с мутацией гена фумарилацетатгидролазы ($FAN^{-/-}$) в печени последних обнаруживались гистологически нормальные очаги регенерации, экспрессирующие FAN. Спустя 4–5 месяцев мыши-реципиенты выглядели здоровыми и имели нормальные уровни билирубина в сыворотке. При молекулярно-биологическом изучении ДНК в очагах регенерации установили, что все 43 очага из 8 мышей содержали больше аллелей мутантного типа, чем донорского типа. Если бы происходила трансдифференцировка в гепатоциты клеток КМ донора или в КМ донора присутствовали бы СК гепатоцитов, очаги регенерации должны были бы содержать, главным образом, донорскую ДНК. Было заключено, что регенерация печеночных очагов у реципиентов трансплантатов $FAN^{-/-}$ происходит из кроветворных кле-

ток донора, которые слились с гепатоцитами реципиента. Применяя клетки КМ, маркированные вирусным вектором и экспрессирующие GFP, идентифицировали общие провирусные соединения в клетках печеночных очагов и в кроветворных клетках. Установили, что после слияния клеток при активации гена FAN, вызванной отменой лечебного препарата, геном донорских кроветворных клеток принимает профиль экспрессии, специфический для гепатоцитов, тогда как пангемопэтический маркер CD45 в этих клетках больше не экспрессируется. Таким образом, экспрессия FAN, наблюдаемая в очагах регенерации печени, представляет собой транскрипционную активацию гена, не проявляющего себя в ядрах кроветворных клеток. Хотя авторы не пытались определить тип клеток КМ, участвующих в слиянии, они предположили, что это были фагоцитирующие клетки Купфера (макрофаги) из-за изобилия последних в печени, близости к гепатоцитам и предрасположенности к слиянию в других условиях [Falzoni и др., 1995; 575, 768]. После слияния геном клеток КМ подвергался перепрограммированию, по крайней мере, в двух проанализированных локусах, в которых как активированные, так и молчащие гены имели сходство с профилями экспрессии гепатоцитов. Слившиеся клетки образовывали гепатоциты нормального вида, которые пролиферировали и максимально корректировали основные метаболические нарушения.

Некоторые исследователи для обнаружения клеточного слияния применили другие генетические маркеры. Alvarez-Dolado и др. [57] использовали клетки КМ, полученные из трансгенных мышей, конститутивно экспрессирующих Cre рекомбиназу и GFP. В качестве реципиентов были взяты трансгенные мыши R26R, экспрессирующие ген-репортер *LacZ* (мыши ROSA^{flax/stop} LacZ). В этой системе при слиянии клеток донора и реципиента рекомбиназа Cre, экспрессируемая в клетках КМ донора, вырезает фланкирующий стоп-кодон LoxP гена *LacZ* в клетках реципиента. В результате этого в гибридных клетках проявляется экспрессия LacZ и становится возможным скрининг X-gal. Предварительно было рассчитано, что любые β -gal⁺ клетки будут продуктами слияния клеток донора и реципиента, тогда как клетки, экспрессирующие GFP без β -gal, представят прямой вклад клеток КМ донора в регенерацию органов без слияния клеток. В ходе исследования в течение 2–10 месяцев после трансплантации наблюдали появление β -gal⁺ гепатоцитов, кардиомиоцитов и нейронов, тогда как в кишечнике, почках, легких и скелетных мышцах β -gal⁺ клетки не обнаруживались [57].

Ряд исследователей [787] использовали в качестве доноров самцов трансгенных мышей GFP, а в качестве реципиентов сингенных самок беспородных мышей. У гибридных мышей отмечали появление двухъядерных нейронов Пуркине, одно ядро которых содержало Y-хромосому, а другое — не содержало. Эта работа, также как и предыдущая, показала, что первичной причиной неожиданного переключения судьбы клеток КМ являлось спонтанное слияние.

Menthen и др. [498] исследовали самок крыс-мутантов F344 с генетическим недостатком сериновой экзопептидазы (DPPA⁻). Этим животным после летального облучения трансплантировали 50×10^6 клеток КМ сингенных самцов F344. Спустя один месяц после трансплантации происходило восстановление КМ реципиентов, за счет донорских кроветворных клеток, определяемых количественной ПЦР, использующей праймеры для гена *srp*, специфического для хромосомы Y. В срезах печени реципиентных самок выявляли, преимущественно в перипортальных регионах, одиночные или небольшие группы DPP4⁺ клеток. Для активации и разрастания овальных клеток в печени реципиентов эти животные были подвергнуты различным видам повреждения печени: обработке D-галактозамином, ретрорзином или 2-ацетиламинофлуореном с частичной гепатэктомией. У крыс всех 3-х групп наблюдали выраженную экспансию и накопление овальных клеток, положительно окрашивающихся на цитокератин-19. Однако со временем большая часть DPP4⁺ клеток рассеивалась. Только у очень небольшого числа овальных клеток (менее 1 %) обнаруживалось двойное мечение DPP4/цитокератин-19. Авторы заключили, что гепатоциты, происходящие из клеток КМ доноров, образуются не вследствие трансдифференцировки прогениторных клеток КМ в овальные клетки, а, вероятно, путем слияния их с резидентными гепатоцитами.

Для выяснения вопроса, какие фракции клеток КМ содействуют клеточному слиянию, использовали клетки КМ мышей, у которых рекомбиназой Cre был выключен специфический ген кроветворной линии в локусе CD45. В таком случае только ГСК экспрессируют белок Cre и обладают способностью активировать ген-репортер β -gal. Было установлено, что в спонтанное слияние вовлекались клетки кроветворной линии в печени, головном мозгу и сердце. Некоторые типы клеток, в том числе скелетные миоциты, трофобласты и макрофаги, в физиологических условиях могли образовывать синцитий путем клеточного слияния. Так как макрофаги широко распространены в организме, активированные макрофаги, происходящие из ГСК донора, могут быть подходящими кандидатами на спонтанное клеточное слияние. Это может объяснить, почему повреждение ткани вызывает увеличение явлений трансдифференцировки в организме.

Samargo и др. [132] показали, что миелоидные клетки, происходящие из ГСК донора, могут сливаться с мышечными клетками реципиентов, способствуя регенерации мышц. Было продемонстрировано, что единичные ГСК, трансплантированные после повреждения кардиотоксином *m. tibialis anterior*, участвуют в регенерации мышечных волокон. В другом эксперименте [133] эти исследователи скрещивали мышей ROSA LacZ и мышей LysM-Cre, у которых рекомбиназа Cre была выключена в регионе специфического гена промотора лизоцима М миеломоноцитарной линии. При последующем повреждении кардиотоксином *m. tibialis anterior* в ней обнаруживались β -gal⁺ миотрубочки, экспрессирующие дистрофин. Эти данные подтверждали, что дифференцированные миелоидные клетки содействуют регенерации мышц. У других исследованных моделей животных мышечные сателлитные клетки, происходящие из ГСК, не обнаруживались. На основании этого заключили, что ГСК содействуют мышечным клеткам не через преспецификацию в миогенные прогениторные клетки, а вследствие наличия потенциала включения в миотрубочки путем слияния.

Rodic' и др. [639] отметили явный тропизм клеток КМ к слиянию с паренхимой одних органов в отличие от других. Это наблюдали также Wagers и др. [771, 772], которые после трансплантации единичных ГСК, экспрессирующих GFP, выявили наличие GFP⁺ паренхиматозных клеток только среди гепатоцитов и нейронов Пуркинье. Alvarez-Dolado и др. [57], отметив, что в физиологических условиях многие гепатоциты и кардиомиоциты имеют два и более ядер, предположили, что слияние с кроветворными клетками может иметь физиологическое значение, поддерживая печень и сердце. Weimann и др. [786, 787] показали, что после трансплантации число слившихся клеток Пуркинье возрастает в течение всего периода наблюдения (до 18 месяцев). В физиологических условиях это был закономерный результат, наблюдаемый после кратковременного повреждения ткани, вызванного облучением. Таким образом, кажется, что клеточное слияние действительно вовлекается в гомеостаз некоторых органов. Это, однако, не исключает возможность проявления этого феномена также в определенных патологических условиях или при заболеваниях [10]. Наличие повышенного числа слившихся клеток Пуркинье у старых животных может указывать на то, что состарившиеся клетки Пуркинье становятся мишенями для клиренса фагоцитами, происходящими из крови. Возможно, что в некоторых случаях этот процесс протекает атипично, приводя к повышению числа слившихся гибридных клеток Пуркинье.

При моделировании пластичности слияние клеток часто отмечается в гепатоцитах, кардиомиоцитах, нейронах Пуркинье и скелетных мышцах [41, 57, 419, 786, 787], но это явление не обнаруживается при исследовании других клеток: почечной мезанглии, эпителия легких и кожи, клеток эндотелия и ПЖ [70, 298, 335, 396, 485, 535]. Как случайное событие слияние клеток может иметь место во многих типах клеток, но только некоторые из них сохраняют жизнеспособность длительное время после этого. Повышенные шансы к выживанию могут иметь клетки, находящиеся в фазе покоя (G0) клеточного цикла (такие как нейроны Пуркинье) или имеющие очень низкую скорость обмена. Многие слившиеся клетки могут погибать при прохождении через фазы S-G2-M, а у некоторых клеток в процессе клеточного деления может возрастать потеря хромосом [10]. Было отмечено более частое выявление слияния в клетках, в которых нередко обнаруживается полиплоидия, например, гепатоцитах, клетках Пуркинье и скелетных мышц [410].

Примечательно, что такие клетки как гепатоциты и ЭСК способны к делению даже при наличии у них в течение длительного времени тетраплоидного генома [419, 730, 762, 783, 824].

Часто отмечали зависимость судьбы слившихся клеток от фенотипа, преобладающего в этих клетках [10]. Клетки КМ сливались с клетками многих типов чаще, чем другие клетки, однако только некоторые клетки сохраняли после слияния фенотип паренхимы. Объяснения этому факту пока нет. В исходе процесса клеточного слияния может иметь значение перепрограммирование ядра, возможно, частичное, под влиянием цитоплазматических факторов, а также содержание предсуществующего белка и мРНК в цитоплазме. Количество и состав клеток паренхимы может при этом быть фактором, определяющим преобладание какого-либо фенотипа [10]. Во всяком случае, все нейроны Пуркинье, гепатоциты, миоциты сердца и скелетные миотрубочки имеют относительно большую цитоплазму. Механизм, определяющий дифференцированное состояние слившихся клеток, точно не известен. Weimann и др. [787] отметили после слияния клеток необходимость реорганизации хроматина и перепрограммирования ядер донорских клеток (рецессивных ядер) для экспрессии гена, специфического для клеток Пуркинье.

Но можно ли на основании приведенных работ, а также исследований, в которых применяли мышей с дефицитом FAN, заключить, что трансдифференцировка никогда не имеет места в гепатоцитах, нейронах Пуркинье, кардиомиоцитах и скелетных мышцах? В любом случае две возможности трансдифференцировки сохраняются [10]: 1) трансдифференцировка как реакция некоторых типов тканей на повреждение и 2) трансдифференцировка в некоторых органах как аналогия клеточному слиянию в других органах. Например, в печени клеточное слияние может отмечаться как при повреждении (недостаток FAN), так и без такой патологии. Но при других типах повреждения (например, воздействие CCl_4) может наблюдаться регенерация печени из клеток КМ без слияния. Сходным образом ишемическое повреждение сердца может индуцировать образование кардиомиоцитов из клеток КМ *de novo*.

Следует отметить также, что в ряде работ последнего времени значение клеточного слияния вообще ставится под сомнение [55, 298, 676, 807, 808]. Tran и др. [750] после трансплантации КМ больным лейкозом выявили относительно большое включение (0,8–12,7 %) клеток КМ донора в буккальный (щечный) эпителий реципиентов. Детальным хромосомным анализом при этом было установлено, что новые эпителиальные клетки имеют кариотип донора, исключающий вовлечение клеточного слияния. Ianus и др. [335] применяли клетки КМ мышей, содержащие трансген рекомбиназы Cre, экспрессированный через промотор инсулина (INS2-Cre). Они трансплантировали эти клетки мышам-реципиентам с Cre-зависимым геном-репортером GFP ($ROSA^{flox/stop}$ EGFP) и не выявили GFP⁺ клеток в ПЖ, что предполагает отсутствие клеточного слияния. Напротив, когда вводили клетки КМ мышей-доноров, содержащих трансген как INS2-Cre, так и $ROSA^{flox/stop}$ EGFP, у реципиентных мышей выявляли GFP⁺ β -клетки ПЖ. Противоположный результат, полученный на этих двух моделях, поддерживает мнение, что клетки КМ являются источником β -клеток ПЖ без участия клеточного слияния.

Harris и др. [298] трансплантировали летально облученным самкам мышей линии Cre, убиквитарно экспрессирующих Cre рекомбиназу, клетки КМ мышей самцов линий Z/EG и β -актин-Cre (отрицательный контроль) или гибридов Z/EG и β -актин-Cre (положительный контроль). Любая клетка у этих моделей, образующаяся от слияния клеток КМ с клетками реципиентов, должна экспрессировать GFP. Спустя 8–12 недель ткани реципиентов (легкие, печень и кожу) проанализировали на наличие клеток донорского происхождения (экспрессирующих Y-хромосому). Было отмечено, что эпителиальные клетки, происходящие из КМ доноров (0, 6 % клеток в легких, 0,1 % — в коже и 0,05 % — в печени), возникли не путем клеточного слияния. Авторы предположили, что они могут быть либо результатом трансдифференцировки клеток КМ, либо происходить из пока неидентифицированной мультипотентной эпителиальной прогениторной клетки КМ.

Ianus и др. [335] установили на основании анализа половых хромосом, что спленоциты донора могут содействовать регенерации островков ПЖ у мышей NOD без причастности слияния. Но надо сказать, что ни в одной из этих работ не приведены все критерии в пользу трансдиффе-

ренцировки. Например, препараты КМ и спленоциты могут содержать прогениторные эндокринные клетки ПЖ, что для клинического использования может быть интересно само по себе. Grant и др. [275] обнаружили, что трансплантация мышам с поврежденной сетчаткой единичных GFP⁺ ГСК приводит к образованию в сосудах сетчатки GFP⁺ эндотелиальных клеток. Другие авторы показали, что GFP⁺ ГСК содействуют экспансии мезангиальных клеток клубочков почки [485]. При этом было отмечено, что у самцов, получивших трансплантат GFP⁺ клеток другого самца, мезангиальные клетки содержали только одну Y-хромосому, хотя не исключалась возможность потери хромосомы при слиянии клеток. Blau и др. [102] предполагают, что гетеротипическое клеточное слияние представляет физиологический процесс, способствующий омоложению и/или восстановлению большого числа тканей. Но Alvares-Dolado и др. [57] считают, что при столь низкой частоте, с какой эти явления отмечаются (обычно для кардиомиоцитов менее 1 %; для гепатоцитов или нейронов Пуркинье менее 0,1 % при неселективной трансплантации на животных моделях), непохоже, чтобы такой редкий феномен значительно содействовал нормальной регенерации. Wagers и др. [771], изучив животных парабионтов, создающих, благодаря тканевым анастомозам, в течение 9 месяцев общую васкулатуру, не обнаружили, несмотря на продолжительное смешивание клеток крови с ГСК КМ, доказательств гомеостатического замещения циркулирующими клетками некроветворных тканей как через физиологическое клеточное слияние, так и посредством трансдифференцировки. Wagers и Weissman [772] предполагают, что при клеточном слиянии, опосредующем регенерацию, был бы необходим физиологический механизм, вызывающий ускоренное старение в тех случаях, когда не происходит гетеротипическое клеточное слияние. Однако в настоящее время нет доказательств, указывающих, что такое слияние клеток необходимо для нормального сохранения ткани. Подобные явления скорее представляют патофизиологический процесс, который отмечается иногда в поврежденных тканях после мобилизации клеток воспаления, способных к слиянию.

7.4. Гетерогенность региональных стволовых клеток как основа проявляющейся пластичности

Некоторые экспериментальные данные позволяют предполагать, что предшественники соматических СК с самых ранних этапов эмбриогенеза могут сохраняться в тканях в течение неопределенного времени. Возможно, это очень небольшая субпопуляция плюрипотентных СК, которая имеющимися маркерами не может быть обнаружена. Suzuki и др. [715] из печени плода мыши выделили клетки, клоны которых были подвергнуты экспансии *in vitro*. Эти клетки реконструировали не только эпителиальные клетки печени и желчных путей, но также эпителий ПЖ и ЖКТ. Как уже отмечалось, из стромы КМ человека и грызунов можно выделить высокопотентные клетки, такие как МАРС, которые способны дифференцироваться в клетки со свойствами мезодермальной, нейроэктодермальной или эндодермальной линий [358, 359]. Anderson и др. [60] поставили вопрос другим образом: может быть образование гетерологичных типов клеток является постоянным свойством всех СК в донорской популяции, но проявление этой способности происходит с крайне низкой степенью воспроизводимости? Эту разновидность нечастого случайного события авторы представляют как «шум роста».

Kucia и др. [410] также считают, что лучше всего пластичность можно объяснить, признав, что КМ, кроме ГСК, содержит другие разнообразные субпопуляции редких тканеккомитированных СК и еще более примитивных плюрипотентных СК. Эти клетки накапливаются в КМ во время онтогенеза, обнаружив там среду, способствующую их выживанию. Популяции гетерогенных СК, находящихся на различных этапах дифференцировки, составляют региональный пул подвижных клеток КМ, которые после повреждения могут мигрировать в периферическую кровь для восстановления тканей.

Аналогично, Владимирская Е. Б. и др. [4] предполагают, что в постнатальный период КМ, богатый сосудистой сетью, представляет собой своеобразное хранилище для СК различных тканей. Выход в циркуляцию СК гетерогенного типа является, по-видимому, избирательным про-

цессом, регулируемым цитокинами, в том числе тканевого происхождения. Quesenberry и др. [606] также заключают, что «пластичность СК — это просто способность клеток дифференцироваться во много различных линий при их помещении в надлежащее окружение. Многие применяют термин трансдифференцировка, когда в действительности нет никаких причин предполагать, что она имеет место».

Во время онтогенеза ткань КМ развивается с запозданием. Гемопоез в КМ устанавливается к концу второго триместра гестации, когда фибробласты и остеобласты ранних костей начинают экспрессировать и секретировать хемокин стромальный фактор-1 (SDF-1). Этот хемокин захватывается рецепторами CXCR4-позитивных ГСК из печени плода, которые сосредотачиваются уже в КМ [845]. На основании изучения трансгенных мышей, нокаутных по SDF-1 или его рецепторам (CXCR4), установили, что ось SDF-1-CXCR4 играет центральную роль в колонизации КМ ГСК и в установлении кроветворения в КМ взрослого организма. Действительно, у эмбрионов мышей с нокаутным хемокином SDF-1 не выявляли притяжения стромой КМ ГСК из печени плода, а ГСК мышей с нокаутными рецепторами CXCR4 не реагировали на градиент SDF-1 и не колонизировали КМ [845]. Таким образом, ось SDF-1-CXCR4 имеет основное значение в регуляции колонизации КМ ГСК во время онтогенеза и в сохранении хоуминга этих клеток во взрослой жизни [410]. Не только ГСК, но также другие тканеккоммитированные СК и, может быть, даже мультипотентные СК циркулируют в периферической крови на высоких уровнях во время быстрого роста тела и экспансии клеток и постепенно накапливаются в КМ, в среде которого они находят все условия для выживания [411, 412, 595, 621]. Эти клетки, подобно ГСК, также экспрессируют CXCR4 и притягиваются лигандом SDF-1 [63; 72, 206, 303, 412, 595, 621]. Следовательно, ось SDF-1-CXCR4 имеет еще дополнительную функцию, определяя движение региональных СК во время органогенеза, а КМ может рассматриваться не только как место накопления CXCR4-позитивных ГСК, а также как ниша разнообразных CXCR4-позитивных тканеккоммитированных клеток (рис. 7.2).

Было предположено, что эти редкие тканеккоммитированные стволовые клетки (ТКСК) могут быть извлечены из суспензии мононуклеарных клеток КМ, используя их хемотаксис к градиенту SDF-1 [410–412, 595]. Действительно, было обнаружено, что клетки, изолированные таким образом из КМ, обогащены мРНК для маркеров ранних скелетных мышц (Myf-5, MyoD, миогенин), кардиомиоцитов (Nkx2.5/Csx, GATA-4, MEF-2C), а также для маркеров нейральных (нестин, GFAP), печеночных (цитокератин-19, α -фетопротейн) клеток и эндокринных клеток ПЖ (Nkx6.1, Pdx1, Ptf1). Но CXCR4-позитивные мононуклеарные клетки КМ обогащены не только мРНК. Иммуногистохимическим окрашиванием в этих клетках была выявлена экспрессия белков, характерных для специфических СК [410]. Подтвердили также наличие в КМ популяции мобильных эндотелиальных клеток предшественников [683]. Так как тканеспецифические СК были обнаружены в пунктах КМ, эти данные объясняют, почему из мононуклеарных клеток КМ удавалось вырастить эндотелиальные [683], скелетные мышечные [523], сердечные [562], нейральные [659], печеночные [401, 589] и панкреатические эндокринные [316, 439, 551] клетки. Эти же данные могут объяснить некоторые результаты трансплантации кроветворной ткани у человека, заключающиеся в обнаружении у реципиентов аллогенного КМ или периферической крови гепатоцитов и холангиоцитов [401, 740], клеток Пуркинье [159, 786], эпидермальных [119, 372], эндотелиальных [360] клеток и эпителия кишечника [401] донорского происхождения.

Феномен циркуляции региональных СК в организме хорошо известен на примере ГСК [Avilion и др., 2003; 429] и также подтвержден в отношении тканеккоммитированных СК эндотелия [683] и сателлитов скелетных мышц и скелета [405]. Предполагается наличие конкуренции CXCR4-позитивных СК с SDF-1-позитивными тканеспецифическими нишами в различных органах за связывание с хемокином SDF-1. Для объяснения, почему циркулирующие региональные стволовые/прогениторные клетки имеют явно более высокое сродство к нишам, располагающимся в специфических для этих клеток органах, не исключают причастность других тканеспецифических хеоматтрактантов [410].

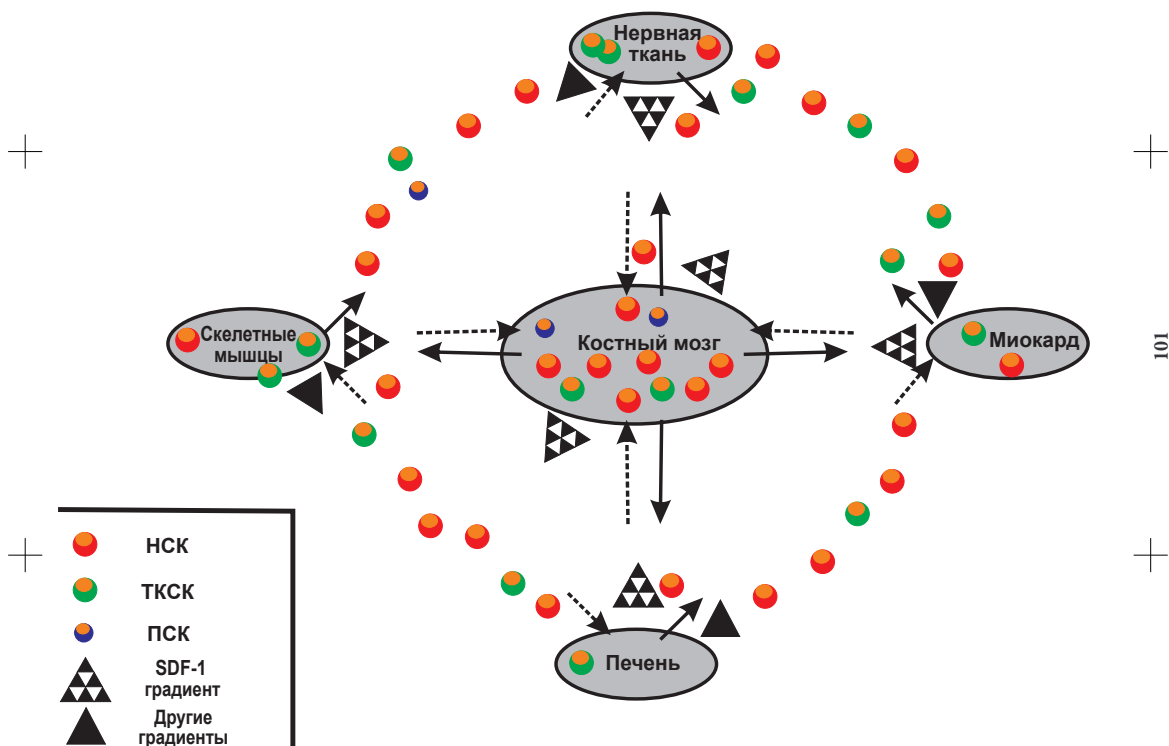


Рис. 7.2. Роль оси SDF-1-CXCR4+ в колонизации костного мозга мигрирующими стволовыми клетками

Циркулирующие CXCR4-ТКСК конкурируют за SDF-1-позитивные ниши в различных тканях/органах. Тканеспецифические стволовые/прогениторные клетки экспрессируют CXCR4 и циркулируют на низких уровнях в периферической крови, поддерживая пул СК в отдаленных частях тела. Число этих клеток в периферической крови повышается во время повреждения ткани (например, при инфаркте сердца, инсульте) или при мобилизации фармакологическими препаратами. Паренхима КМ является источником многих других хемоаттрактантов СК, кроме SDF-1, а также факторов выживания. Они обеспечивают окружающую среду, которая вызывает хоуминг ТКСК. Паренхима КМ становится «home» или «убежищем» не только для ГСК, но также для уже дифференцированных циркулирующих ТКСК и, возможно, также для плюрипотентных СК. По данным Kucia и др. [410].

Было установлено, что число циркулирующих CXCR4-позитивных региональных в периферической крови может возрасть под влиянием такого цитокина как G-CSF [412], обычно мобилизующего ГСК, а также стрессовых факторов, связанных с повреждением [409]. Повышение содержания этих клеток в периферической крови во время повреждения ткани/органа поддерживает предположение, что они играют важную роль в восстановлении ткани [410]. При этом мобилизуются не только СК, осевшие в поврежденном органе, но также рекрутируются собственные региональные СК, находящиеся в отдаленных нишах этой ткани, которые сохранялись как запасной пул. Так как восстановление поврежденного органа связано не только с экспансией паренхиматозных клеток, но и с их неоваскуляризацией [301, 316, 611], не удивительно, что во время регенерации можно выявить повышение числа клеток-предшественников для эндотелия.

Лиганд SDF-1 секретируется происходящими из КМ фибробластами/остеобластами [845], а также стромой и эндотелиальными клетками некоторых органов, таких как сердце [66], скелетные мышцы [595], печень [398], мозг [72] и почки. Секреция SDF-1 значительно увеличивается при повреждениях тканей, которые обнаруживаются в случае инфаркта сердца, ишемии конечности, токсического поражения печени или общего облучения, и этот хемокин может иметь

большое значение в привлечении CXCR4-позитивных региональных СК, необходимых для регенерации органа/ткани [409–412, 621]. Экспрессия SDF-1 в эндотелиальных клетках повышается под влиянием фактора транскрипции, вызывающего гипоксию (Hypoxia induced factor, HIF-1) [141]. Помимо того, что HIF-1 регулирует экспрессию SDF-1 в гипоксичных тканях, он повышает экспрессию CXCR4 в клетках [666] и может влиять на хемоаттракцию CXCR4-позитивных ТКСК к эндотелию и другим тканям. Таким образом, ось SDF-1-CXCR4 регулируется, по всей вероятности, HIF-1 как на уровне лигандов, так и на уровне рецепторов [410].

Поскольку SDF-1 сам по себе или в комбинации с другими факторами влияет на хоуминг циркулирующих CXCR4-позитивных СК в их тканеспецифические ниши, конкуренция за такие SDF-1-позитивные ниши может объяснить, почему в различных органах и/или тканях можно обнаружить, кроме органоспецифических региональных СК, также региональные СК, специфические для других органов [409–412, 595, 621]. Примечательно, что благодаря оси SDF-1-CXCR4 выявляется некоторое сходство кроветворной системы и ЦНС [159]. SDF-1, который имеет отношение к экспансии СК, активации зрелых клеток крови и хоумингу лимфоцитов, а также рецепторы CXCR4 важны для трансдифференцировки ГСК в клетки других органов, например, печени и кровеносных сосудов [303]. Но ось SDF-1-CXCR4 проявляет себя также в течение всей жизни в развитии мозга и гиппокампа, вовлекаясь в созревание новообразованных нейронов [159].

7.5. Анализ механизмов пластичности

Работы, опровергающие прежнюю догму тканевой специфичности региональных СК, встречаются в научной среде со значительным скептицизмом. Причинами этого, по мнению Запорожана В. Н. и Бажоры Ю. М. [11], являются: 1) низкая частота, с которой происходит явное линейное переключение; 2) постоянная недостаточность доказательств, что пластичность является результатом жизнедеятельности единичной региональной СК, которая дифференцируется более чем в одну функционально охарактеризованную линию; 3) отсутствие независимого подтверждения результатов многих работ; 4) противоречие ряда работ, посвященных линейному переключению, устоявшимся понятиям в биологии развития.

При исследовании пластичности прежде всего необходимо точно знать источник трансплантированной популяции, все направления дифференцировки потомков которой должны быть представлены с полным фенотипическим описанием. К сожалению, большая часть применяемых клеточных маркеров не позволяет провести точную идентификацию клеток *per se*, так как эти маркеры часто экспрессируются клетками разных тканей. В качестве примера можно привести перекрытие маркерами дифференцировки эндотелиальных и гемопоэтических клеток такого маркера как PECAM (CD31) [345] или маркера эпителия желчных протоков DPP4 (CD26) на лимфоцитах [264]. Поэтому необходим тщательный выбор маркера, который бы не был экспрессирован на СК донора и позволял бы, один или в комбинации с другими маркерами, точно идентифицировать тип клетки. Кроме того, анализ маркера должен быть дополнен данными о функции пересаженных клеток.

В настоящее время из всех предполагаемых механизмов пластичности региональных СК отдать предпочтение какому-нибудь одному затруднительно. Наибольшее внимание сейчас уделяется тем концепциям пластичности, которые пытаются объяснить не только приобретение клетками нового фенотипа, но и межлинейные переключения клеток. По мнению Martin-Rendon и Watt [482], у СК или их ближайших потомков имеются 4 альтернативных пути для обеспечения переключения с одной линии на другую. **Первый путь — транс-детерминация**, при которой СК, запрограммированные на образование определенной линии, в силу каких-то причин направляют свой потенциал на образование других СК, обеспечивающих размножение клеток, соответствующих новому направлению. Такая ситуация развивается, например, при культивировании *in vivo* клеток личинки дрозофилы с ее имагинальными дисками [489]. У насекомых из имагинальных дисков развиваются такие специализированные органы, как крылья и конечности. Мезодермальные клетки, трансплан-

тированные между дисками, в основной своей массе сохраняют свое предназначение, но отдельные из них начинают соответствовать новой локализации и приводят к образованию у личинки обычно отсутствующих органов взрослой стадии (имаго). На основании этого наблюдения предполагается, что некоторые СК имеют мультипотентного предшественника, не подвергающегося специализации в определенную линию.

По современным представлениям специфическое направление развития определяется комбинацией транскрипционных факторов. В норме конверсию одной клетки в другую можно вызвать путем изменения комбинации этих факторов. В некоторых случаях доминирование определенного состояния вызывает наличие только одного фактора, действующего подобно «козырной карте» в навязывании специфического пути развития при наличии также других факторов [696]. В качестве примеров приводят транскрипционные факторы семейства MyoD типа спираль-петля-спираль (helix-loop-helix), которые могут вызывать дифференцировку мышцы из многих типов клеток в культуре [788], или фактор *eyeless/pax6*, который у дрозофилы способен вызвать развитие глаза из имажинальных дисков. Гены, кодирующие эти факторы транскрипции, характеризуются как «контрольные гены» (master genes), хотя они никогда не способны сами по себе определить развитие какого-нибудь клеточного типа, так как их «контролирующие» свойства всегда зависят от связи с другими транскрипционными факторами, которые определяют их активность [696].

Второй путь — трансдифференцировка — процесс, при котором среди дифференцированных клеток появляются клетки, проявляющие другой фенотип. Мы рассматривали подробно этот процесс в качестве одного из возможных механизмов пластичности. Широкое обсуждение в печати вызвала работа Bjornson и др. [99] по трансплантации НСК сублетально облученным животным. Эти НСК предварительно культивировались в среде с ростовыми факторами (b-FGF и EGF). После внутривенного введения НСК реципиентам установили, что из них образовались клетки крови. Но эта работа проводилась на эмбрионах мышей большого срока гестации (E14). На этой стадии у них уже хорошо развито кровоснабжение мозга и невозможно выделить нейральные клетки без контаминации их циркулирующими кроветворными клетками. В подобной же работе, проведенной позднее Morshead и др. [518], трансдифференцировку НСК в кроветворные клетки не смогли обнаружить. Эти авторы трансплантировали 12×10^6 меченых НСК, прокультивированных в среде с митогенами, и изучили 31000 колоний КМ, образовавшихся у облученных реципиентов. Ни одной меченой клетки в колониях кроветворных клеток не было обнаружено. Morrison и др. [517] изучили судьбу потомков нейральных клеток, экспрессирующих у трансгенных зародышей маркерный ген *Wnt-1* в зачатке среднего мозга, дорзальных участках нервной трубки и в нервном гребне. У взрослых трансгенных мышей клетки, экспрессирующие ген *Wnt-1*, были обнаружены в ЦНС и периферической нервной системе, а также у производных нервного гребня. Меченых клеток не было среди клеток крови, в скелетных мышцах, паренхиме печени, легких, почках и в других тканях. Таким образом, свойства НСК, прокультивированных в среде с ростовыми факторами, а затем трансплантированных в организм облученного животного, не соответствовали свойствам и судьбе нейрогенных предшественников при нормальном эмбриогенезе [10]. Это свидетельствовало, что для проявления трансдифференцировки было необходимо соответствующее микроокружение [784]. В другой работе у клеток, выделенных из нейросфер плода и также подвергнутых разрастанию *in vitro* под влиянием EGF и/или b-FGF, наличие кроветворного потенциала не смогли обнаружить, хотя у иммунодефицитных мышей SCID-hu эти клетки обеспечивали длительное кроветворение из фрагментов костей человека [684].

Сторонники гипотезы трансдифференцировки утверждают, что только единичные клетки из популяции КМ самца мыши (Lin^- , CD34^+ и Sca-1^+) могут после введения самкам реципиентам (вместе с поддерживающими их кроветворными прогениторными клетками самки) привести к образованию эпителиальных клеток. Однако, вопреки этому, Krause и др. [402] наблюдали спустя 11 месяцев после такой трансплантации удивительно высокую пропорцию новообразован-

ных пневмоцитов типа II, хотя в других тканях клеток, содержащих Y-хромосому, было немного; например, среди цитокератин-позитивных клеток в коже их было только 2 %. Высокий уровень разрастания клеток в легких пытались объяснить либо повреждением этого органа облучением, проводимым с целью исключения эндогенного КМ из содействия пересаженным клеткам, либо вирусной инфекцией, развивающейся у реципиентов с временно подавленным иммунитетом.

Подверглась критике также работа Korbling и др. [401], в которой отмечалась способность кроветворных клеток, циркулирующих в крови человека, трансформироваться в гепатоциты, эпителий ЖКТ и эпидермиса. По мнению редактора журнала «New Engl. J. of Med», опубликовавшего эту работу, выводы авторов нельзя признать обоснованными из-за серьезных ошибок, допущенных при культивировании клеток и в цитологических исследованиях [42]. Не располагая надежными маркерами, нельзя отличить клетки донора от клеток реципиента. Осталось невыясненным, какие именно клетки КМ донора трансдифференцировались в иные клеточные типы. Эти замечания можно отнести также к ряду других публикаций [589, 734, 740]. Так как КМ содержит СК эндотелия, не удивляет, что, по данным одного исследования [683], в выстилке сосудов реципиента были обнаружены клетки с маркерами трансплантированного КМ.

Одна из работ, оспаривающих наличие способности к трансдифференцировке у региональных СК, в частности у ГСК, принадлежит Wagers и др. [771]. Эти авторы для выявления пластичности ГСК КМ использовали химерных животных, которых получали, трансплантируя единичные ГСК КМ (c-kit⁺, Thy1.1^{lo}, Lin⁻, Sca-1⁺) трансгенных мышей, конститутивно экспрессирующих GFP, летально облученным нетрансгенным реципиентам. У 18 % реципиентов введение единичных ГСК, меченных GFP, приводило к значительному продолжительному мультилинейному разрастанию кроветворных клеток (лимфоидных и миелоидных) в периферической крови. У некоторых реципиентов до 70 % циркулирующих клеток оказывались донорского происхождения. Однако в некроветворных тканях GFP⁺ клетки не обнаруживались. В 60 сагитальных срезах мозга выявили только одну GFP⁺ клетку Пуркинье. Из 70000 гепатоцитов только одна клетка экспрессировала GFP, но при этом не экспрессировала маркеры гепатоцитов. Эти же авторы исследовали химеризм у парабитических животных, из которых одно было трансгенное, а другое — нетрансгенное. Химеризм кроветворных клеток в крови и селезенке парабитонтов выявляли уже через 2–3 дня после соединения сосудов животных, а разрастания этих клеток обнаруживались через 2–3 недели после операции. Несмотря на высокие показатели перекрестного роста кроветворных клеток у парабитонтов, в их некроветворных тканях не наблюдали приживления циркулирующих ГСК или других прогениторных клеток. Изучили также влияние трансплантации GFP⁺ ГСК на регенерацию эпителия кишечника нетрансгенных мышей после повреждения кишечника облучением брюшной полости. CD45⁺ и GFP⁺ клетки легко определялись в поврежденном кишечнике реципиентов, но среди приблизительно 640000 исследованных клеток эпителия кишечника (36 срезов) GFP⁺ клеток не обнаружили. Авторы заключили, что «трансдифференцировка» циркулирующих ГСК и/или их потомства крайне редкое событие, если вообще оно происходит. Даже тяжелое повреждение не индуцирует пластичности ГСК. В КМ, возможно, содержатся клетки со способностью дифференцироваться в некроветворные клетки, но они не являются ГСК.

Противоречия также обнаруживаются в вопросе, касающемся способности КМ содействовать росту нейральной ткани. Mezey и др. [504], изучающие гомозиготных самок мутантных мышей PU.1, установили, что трансплантат КМ беспородных самцов спасает облученных самок PU.1 от гибели. После трансплантации до 4,6 % клеток ЦНС самок показывали наличие Y-хромосомы и до 2,3 % Y-позитивных клеток содержали маркеры нейральных клеток. В отличие от этих авторов, Castro и др. [139] у 8 летально облученных самок реципиентов SP клеток доноров самцов линии ROSA26 и у 12 реципиентов цельного КМ самцов признаков нейрональной дифференцировки не обнаружили. Трудно объяснить эти противоречивые результаты, хотя следует отметить, что экспериментальные условия в последних двух работах были не во всем идентичны [50]. Одно дело, если циркулирующая клетка, разросшаяся в каком-либо органе, принимает некоторые или

все фенотипические признаки этого органа, и другое — утверждать, что введенная клетка стала СК в своей новой нише. Обнаружение трансдифференцированных клеток должно подкрепляться выявлением значительной клональной экспансии, для которой необходимо постоянное давление селекции, благоприятствующей трансплантированным клеткам [419, 781].

Третий путь к новой специфичности обеспечивает **процесс дедифференцировки прогениторных клеток**, сопровождающийся дифференцировкой в другие линии. Такой процесс можно наблюдать у тритонов, подвергшихся ампутации отдельных частей тела. Миоциты при этом подвергаются дедифференцировке с последующим образованием клеток многих различных линий (Casimir, 1988). Наконец, **четвертый путь** характеризуется **клеточным слиянием**, в процессе которого гибридные клетки приобретают плюрипотентный фенотип. Развитие такого фенотипа отмечается при индуцированном слиянии ЭСК и соматических клеток [719, 720]. Клеточное слияние составляет основу терапевтического клонирования. Как теперь хорошо известно, зрелое ядро клетки с линейноограниченной программой развития может быть перепрограммировано при переносе его в энуклеированную яйцеклетку, в которой ядро оказывается в окружении, запрограммированном на образование многих других или даже любых тканей (подробнее см. главу 8). Перенесенные ядра клеток взрослых особей показывают в этих условиях потенциал развития, не отличающийся от потенциала ядра раннего эмбриона [717].

Особенно часто в научной литературе подвергается обсуждению проблема мультилинейной специфичности ГСК. Действительно, несмотря на наличие отдельных экспериментальных доказательств содействия СК кроветворных тканей регенерации некроветворных тканей, особенно после повреждения последних, рассмотрение проблемы пластичности СК нуждается в критической оценке [482]. Первый ключевой вопрос, возникающий в процессе такого обсуждения, касается определения типа изучаемых клеток. Гетерогенность региональных СК во многих тканях может иногда объяснить проявляющуюся пластичность тканеспецифических региональных СК. КМ является примером гетерогенной ткани, содержащей не только ГСК, но также МСК, эндотелиальные СК, гемангиобласты, МАРС, а также плюрипотентные и тканекоммитированные СК, о которых говорилось выше. Даже тщательно очищенные ГСК гетерогенны по поверхностным маркерам, функции и потенциалу развития. Кроме того, нет таких маркеров, которые были бы экспрессированы только на ГСК [482]. Поэтому идеальной может считаться только популяция, происходящая из единичной, идентифицированной или маркированной клетки. В работах Krause и др. [402], Grant и др. [275], Clarke и др. [156, 157], Jiang и др. [358], Johe и др. [361], Wang и др. [781] есть как раз то, что необходимо. В них показано, что единичные клетки или несколько таких клеток, полученных путем клонирования из одной клетки, дифференцируются в клетки, не принадлежащие к тому органу, из которого происходили эти единичные клетки. Так, Krause и др. [402] сообщили, что единственная подвергшаяся хоумингу ГСК не только дала потомство, восстанавливающее кроветворную систему, но ее потомки, правда с низкой частотой, обнаруживались в эпителии печени, кишечника, легких и кожи, в котором они приобретали морфологическую и фенотипическую, но не функциональную, характеристику этих эпителиальных тканей. Grant и др. [275], применяя тот же подход, установили, что единичные ГСК, трансплантированные летально облученным мышам, вызывали образование не только кроветворных клеток, а также эндотелиальных клеток сосудов роговицы, которые были перед этим повреждены. В отличие от данных Krause и др., в работе Grant и др. отмечено приобретение дифференцированным потомством функциональных свойств, так как наблюдали восстановление поврежденной роговицы.

Следует отметить, что некоторые исследователи [152, 509, 593, 761], изучающие потомство единичных клеток, хотя отмечали небольшие проявления пластичности, не смогли получить тех данных, о которых сообщали другие авторы. Это приводило к попыткам сравнительного анализа условий опытов во всех случаях. Обращали внимание на различия в возрасте или линии используемых животных, которые могут определять потенциал пластичности. Например, фенотип ГСК у молодых мышей (3–5 недель) отличается от фенотипа у более старых животных (свыше 5 недель). Отмечали, что одни исследователи анализировали приживление СК/прогениторных клеток

через 11 месяцев, тогда как в других случаях эту работу проводили через 4–9 месяцев. Фиксировали внимание на применении разных методов очистки и обогащения клеток, неодинаковых условиях их предварительного культивирования. Подчеркивалось значение удаления кроветворных клеток-предшественников и селекции «наиболее ранних» СК с более высоким уровнем пластичности [739]. Указывали, что даже изучение пластичности на парабиотических моделях может приводить к разным результатам, если не будет учтена необходимость повреждения реципиента для возбуждения феномена пластичности [358]. Также обращали внимание на существование технических проблем, которые могут вводить в заблуждение. Большинство работ по определению пластичности клеток КМ *in vitro* или *in vivo* основывается на выявлении сочетанной экспрессии маркеров донорских клеток, Y-хромосом, генов GFP или β -gal. Применение такого маркера как Y-хромосома для подтверждения происхождения клеток из КМ донора самца не вызывает замечаний, но использование трансгена GFP, экспрессированного цитомегаловирусом на промоторе β -актина цыпленка, не гарантирует, что все клетки КМ будут экспрессировать GFP после дифференцировки в кроветворные клетки [739]. Некоторые ошибочные отрицательные результаты исследований, проведенных на трансгенных мышях ROSA 26, объясняли тем, что у этих мышей в отдельных тканях проявляется нестабильность трансгена, а определение гена β -gal чувствительно к условиям фиксации и окрашивания [283]. При анализе экспериментов, в которых применялись строгие условия и надлежащие контроли, иммуногистохимические и иммунофлуоресцентные методы обычно обеспечивали достаточную надежность, но оптимальный метод для выявления специфического окрашивания отдельных клеток пока не разработан.

Большинство исследователей в качестве критерия определения НСК используют нейросферы клоногенного происхождения, содержащие клетки, способные к дифференцировке в глию и нейроны [699]. При трансплантации клеток из нейросфер сублетально облученным аллогенным мышам у реципиентов выявляли восстановление кроветворной системы [684]. Другие авторы [Magrassi и др., 2003] поставили цель проверить, будут ли проявлять кроветворный потенциал СК/прогениторные клетки, выделенные из мозга мыши. Для исключения возможности контаминации кроветворными клетками донорские клетки выделяли из мозга мышей, у которых еще не завершился процесс вставания в мозг кровеносных сосудов (E10, 5). Нейральные клетки из мозга плодов трансгенных мышей, экспрессирующих высокое содержание GFP, при трансплантации внутривенно или прямо в КМ сублетально облученным мышам C57BL/6 не подвергались трансдифференцировке в кроветворные клетки в течение 16 месяцев после трансплантации, хотя клетки костномозгового происхождения выявлялись в КМ реципиентов уже со 2-й недели после трансплантации. Clarke и др. [157, 158], работающие с клонами НСК, после введения единичных НСК в бластоцисты мышей обнаружили пополнение потомством этих клеток множества тканей. Однако ни один из носителей этих клеток не был рожден, что не позволяет оценить функциональные возможности состоявшейся дифференцировки. Но Jiang и др. [358], введившие в бластоцисту единичную MAPC, полученную из КМ, установили, что 33 % потомков этой клетки дали активное сбалансированное химерное потомство.

Следует выделить ряд работ, в которых показано, что клетки, полученные явным линейным переключением дифференцировки, приобретают не только фенотипическую, но и функциональную характеристику нового клеточного типа. Так, MAPC, выделенные из КМ, могут дифференцироваться в клетки, обладающие не только морфологической и фенотипической характеристикой гепатоцитов, а также приобретающие некоторые функции этих клеток, такие как секреция альбумина и мочи и образование цитохрома P450, индуцируемое фенобарбиталом [669]. Однако механизмы линейного переключения дифференцировки нуждаются в дальнейшем изучении. Низкая частота слияния клеток, отмечаемая при выявлении трансдифференцировки [Magrassi и др., 2003; 359], не обеспечивает надежной поддержкой эту концепцию пластичности, тогда как последние данные, подтверждающие слияние клеток у мышей FAN при образовании функционирующих клеток печени из прогениторных клеток КМ [762, 783], выглядят очень убедительно. Возможно, правда, что ген *FAN* может быть легкой мишенью для активации после слияния клеток [482].

Таким образом, дополнительного исследования заслуживает вопрос, как быстро экспрессия гена репрограммируется в гибридных клетках. В тканях с быстрым обменом, таких как кровь и кожа, активация СК может, вероятно, происходить через регулярные интервалы, а в других тканях она может иметь место только после повреждения клеток и развития патологического процесса.

При освещении данной темы нельзя не отметить, что некоторые исследователи склонны считать, что значение такого редкого биологического явления как способность СК к преодолению линейных барьеров преувеличивается из-за его удивительной природы [60]. По мнению Johnson S., это свойство СК можно сравнить со способностью собаки ходить на задних лапах. «Это не так важно, хорошо ли она это делает, но вообще-то она делает это» [цит. по 60]. Демонстрации, что клетки, происходящие из одного органа, могут трансформироваться в клетки другого органа и выполнять нормальную функцию последних, исключительно редкие. Современные исследования в этом направлении нуждаются в высоких стандартах работы. Во-первых, донорская популяция должна быть выделена и трансплантирована надлежащим образом, не подвергаясь лишним манипуляциям, чтобы исключить возможность приобретения новых свойств *in vitro*. Некоторые случаи такого перепрограммирования приводились в литературе [93, 208, 399, 570]. Во-вторых, трансплантированные СК должны вызывать образование здоровых и способных к регенерации тканей-мишеней. В-третьих, фенотип трансформированных клеток должен быть изучен не только на морфологическом и молекулярном, но также и на функциональном уровне [50].

Theise и Harris [736] предлагают при обсуждении вопросов пластичности придерживаться следующих условий:

1. Рассматривать пластичность как обобщенный символ «потенциала дифференцировки», физиологическая экспрессия которого проявляется в осуществлении одного из возможных путей развития.

2. Молекулярные процессы, лежащие в основе наблюдаемой пластичности, должны быть на уровне современных знаний, в связи с чем не могут не рассматриваться данные об эпигенетической обратимости генных рестрикций (см. главы 5 и 8). Эти данные должны противопоставляться механистической сущности пластичности.

3. Необходимо рассмотрение стохастической природы генной экспрессии и, следовательно, судьбы клетки (см. главу 5). Но стохастическое не должно подразумевать полностью случайное, а скорее — вынужденно случайное, промежуточное между закослелым детерминизмом и полной хаотичностью. Возможные источники такой вынужденной хаотичности должны обсуждаться.

4. Для объяснения поведения клеток желательно применять анализ сложных систем (см. главу 5). Предполагают, что клетки *in vivo* ведут себя как взаимодействующие объекты, вызывающие подключение региональной самоорганизации клеточных линий, тканей, органов и всего организма. Эти взаимодействия являются частью иерархии сложных систем, но сами они оказываются следствием самоорганизации биомолекул, из которых состоят.

5. Планирование и обсуждение экспериментальных данных должно проводиться на основе представленной концепции.

Региональные СК являются мощным инструментом для изучения процессов самообновления и дифференцировки. Еще не так давно исследователи применяли СК и коммитированные клетки их потомства только для оценки ростовых факторов и других экстраклеточных сигналов, необходимых для развития ткани. В настоящее время региональные СК человека и их дифференцированное потомство должны широко изучаться для определения тех генетических программ, которые необходимо задействовать для осуществления дифференцировки клетки [813]. ГСК уже сейчас применяются в медицине для лечения гемопоэтических нарушений и для поддержки больных злокачественными заболеваниями, получающих интенсивную химио- или радиотерапию. Предполагается, что уже в ближайшее время с достижением успехов в получении характеристики популяций региональных СК ряда тканей, таких как головной и спинной мозг, печень, ПЖ, роговица, кожа, терапия региональными СК может стать главным методом лечения наследственных или приобретенных заболеваний этих тканей. В случае подтверждения высокого потенциала диффе-

ренцировки региональных СК их можно будет применять для лечения дегенеративных или генетических нарушений многих органов. При обеспечении сигналов *in vivo* для индукции органной или линейноспецифической дифференцировки, достаточных для восстановления органа-мишени, региональные СК смогут применять даже без предварительного определения их пластичности.

В период эмбриогенеза/онтогенеза развитие СК происходит в иерархической манере, начиная с популяций наиболее примитивных плюрипотентных СК, способных вызвать в ранней гастрوله образование тканей всех трех зародышевых листков, к унипотентным региональным СК. Последние будут сохраняться в тканях и органах взрослой особи в виде пула самообновляющихся клеток (т.е. тканеккоммитированных СК) для эпидермиса, КМ, эндотелия, печени, мышц, сердца, эндокринной ПЖ, канальцев почки и др.

Применение экспериментальных систем может обеспечить разработку методологии, способной репрограммировать человеческие клетки для применения их в клинике [274]. Регенерация паренхиматозных органов под влиянием клеток КМ имеет огромное значение для клиники. В настоящее время уже показано, что спонтанное клеточное слияние и последующее перепрограммирование играют роль в регенерации и гомеостазе некроветворных паренхиматозных органов. Однако остается еще выяснить, имеет ли существенное значение трансдифференцировка региональных СК, например, ГСК или НСК. На симпозиуме по биологии СК, проведенном в рамках годовой конференции Американской ассоциации исследований канцерогенеза (AACR), состоявшейся в апреле 2002 г., большое внимание было уделено обсуждению пластичности СК [448]. Была сформулирована гипотеза, что ГСК, первоначально появившись в КМ, затем могут находиться в покоем состоянии не только в КМ, но и в других органах, не имеющих никакого отношения к кроветворению. Именно такие клетки способны дедифференцироваться и редифференцироваться. Эти представления увязываются с новыми экспериментальными данными, показавшими, что из мышц можно выделить СК, которые восстанавливают кроветворение, хотя за счет этих клеток регенерация мышц не происходит [495]. В то же время исследователи, детально изучавшие нейрогенез в субэпендимальном слое головного мозга, пришли к заключению, что этот процесс не может осуществляться за счет ГСК, изначально находившихся или случайно попавших в головной мозг [Steindler, Pincus, 2002].

Хотя количество наблюдений, описывающих трансдифференцировку, продолжает возрастать, сообщения о них подвергаются критике из-за отсутствия тех или иных важных доказательств. Большинство этих работ не отвечают в полной мере критериям, принятым в качестве обязательных для доказательства трансдифференцировки [771]: трансплантация единичных региональных СК, множественные доказательства функциональной дифференцировки и надлежащий генетический анализ. Рядом исследователей [441, 764] сформулированы условия, которых необходимо придерживаться для подтверждения феномена пластичности. В числе этих условий: 1) проведение клонального анализа, заключающегося в получении полной характеристики единичных, тщательно очищенных или индивидуально маркированных клеток; 2) надежные уровни пластической дифференцировки, т.к. крайне редкое событие трудно анализировать и оно может оказаться следствием артефакта; 3) демонстрация тканеспецифической функции «трансдифференцированных» типов клеток. В нескольких работах с ГСК, проведенных с учетом критических условий, не смогли подтвердить ранее отмеченные значительные уровни некроветворных разрастаний [682, 772]. Некоторые опыты «трансдифференцировки», повторенные с применением тщательно очищенных ГСК, подвергаемых сильному давлению селекции на исход процесса, оказались не результатом изменения судьбы ГСК, а следствием слияния клеток крови с некроветворными клетками [57, 132, 783].

В связи с тем, что трудно получить специфические для больного или для его заболевания СК, которые требуются для эффективной клеточной терапии, большой интерес представляют направления, позволяющие приблизиться к решению этой проблемы. Одним из таких направлений является индукция плюрипотентного состояния в соматических клетках путем прямого их репрограммирования. Работы японских и американских исследователей [704–706, 793, 794, 813,

815], сообщивших об индукции плюрипотентных СК из фибробластов кожи и соматических клеток взрослых мышей и человека под влиянием определенных генов или транскрипционных факторов, производят ошеломляющее впечатление.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Abe Y., Kouyama K., Tomita T., et al. Analysis of neurons created from wild-type and Alzheimer's mutation knock-in embryonic stem cells by a highly efficient differentiation protocol // *J. Neurosci.* — 2003. — Vol. 23. — P. 8513–8525.

Avilion AA., Nicolis SK., Pevny L., et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function // *Genes Dev.* — 2003. — Vol. 17. — P. 126–140.

Conrad C., Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery // *J. Surg. Research.* — 2005. — Vol. 124. — P. 201–208.

Corti S., Locatelli F., Strazzer S., et al. Modulated generation of neuronal cells from bone marrow by expansion and mobilization of circulating stem cells with in vivo cytokine treatment // *Exp Neurol.* — 2002. — Vol. 177. — P. 443–452.

Falzone S., Munerati M., Ferrari D., et al. The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role // *J. Clin. Invest.*, — 1995. — Vol. 95. — P. 1207–1216.

Ferrari G., Stornaiuolo A., Mavillo F. Failure to correct murine muscular dystrophy // *Nature.* — 2001. — Vol. 411, 6841. — P. 1014–1015.

Fiegel H. C., Lioznov M. V., Cortes-Dericks L., et al. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells // *Stem Cells.* — 2003. — Vol. 21. — P. 98–104.

Fukada S., Miyagoe-Suzuki Y., Tsukihara H., et al. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice // *J Cell Sci.* — 2002. — Vol. 115. — P. 285–293.

Hao H. N., Zhao J., Thomas R. L., et al. Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro // *J Hematother Stem Cell Res.* — 2003. — Vol. 12. — P. 23–32.

Hess D., Hill W. D., Martin-Studdard A., et al. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN⁺ expressing cells after stroke // *Stroke.* — 2002. — Vol. 33. — P. 1362–1368.

Huss R. CD34⁺ stem cells as the earliest precursors of hematopoietic progeny // *Exp. Hematol.* — 1998. — Vol. 26. — P. 1022.

Imai E., Ito T. Can bone marrow differentiate into renal cells? // *Pediatr. Nephrol.* — 2002. — Vol. 17. — P. 790–794.

Imasawa T., Utsunomiya Y., et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2001. — Vol. 12. — P. 1401–1409.

Kale S. K. A., Clark P. R., Kashgarian M., et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 112. — P. 42–49.

Kalka C., Masuda H., Takahashi T., et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 3422–3427.

Kanazawa Y., Verma I. M. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 11850–11853.

Kawada H., Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle // *Blood.* — 2001. — Vol. 98. — P. 2008–2013.

Kleeberger W., Rothamel T., Glockner S., et al. High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis // *Hepatology.* — 2002. — Vol. 35. — P. 110–116.

Koshizuka S., Okada S., Okawa A., et al. Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* — 2004. — Vol. 163, N.1. — P. 64–72.

- Kotton D.N., Ma B.Y., Cardoso W.V., et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium // *Development*. — 2001. — Vol. 128. — P. 5181–5188.
- Lechner A., Yang Y.G., Blacken R.A., et al. No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic β -cells in vivo // *Diabetes*. — 2004. — Vol. 53. — P. 616–623.
- Mahmood A., Lu D., Wang L., et al. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells // *Neurosurgery*. — 2001. — Vol. 49. — P. 1196–1203.
- Mangi A.A., Noiseux N., Kong D., et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevents remodeling and restores performance of infarcted hearts // *Nat Med*. — 2003. — Vol. 9. — P. 1195–2001.
- Magrassi L., Castello S., Ciardelli L., et al. Freshly dissociated fetal neural stem/progenitor cells do not turn into blood // *Mol. Cell Neuroscience*. — 2003. — Vol. 22. — P. 179 — 187.
- Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts // *Nature*. — 2004. — Vol. 428. — P. 664–668.
- Oh S.H., Miyazaki M., Kouchi H., et al. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into hepatocyte lineage in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2000. — Vol. 279. — P. 500–504.
- Ono K., Yoshihara K., Suzuki H., et al. Preservation of hematopoietic properties in transplanted bone marrow cells in the brain // *J. Neurosci. Res.* — 2003. — Vol. 72. — P. 503–507.
- Poulsom R., Forbes S.J., Hodivala-Dilke K., et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration // *J Pathol.* — 2001. — Vol. 195. — P. 229–235.
- Reinecke H., Poppa V., Murry C.E. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting // *J. Mol. Cell Cardiol.* — 2002. — Vol. 34. — P. 241–249.
- Safford K.M., Hicok K.C., Safford S.D., et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2002. — Vol. 94. — P. 371–379.
- Shimizu K., Sugiyama S., Aikawa M., et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy // *Nat. Med.* — 2001. — Vol. 7. — P. 738–741.
- Steindly D.A., Pincus D.W. Stem cells and neurogenesis in the adult human brain // *Lancet*. — 2002. — Vol. 359. — P. 1047–1054.
- Stoner D.L., Weissman I.L. Somatic and germ cell parasitism in a colonial ascidian: possible role for a highly polymorphic allorecognition system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1996. — Vol. 93. — P. 15254–15259.
- Suratt B.T., Cool C.D., Serls A.E., et al. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation // *Am J Respir Crit Care Med*. — 2003. — Vol. 168. — P. 318–322.
- Tomita S., Li R.K., Weisel R.D., et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function // *Circulation*. — 1999. — Vol. 100. — P. 11247–11256.
- Tomita S., Mickle D.A., Weisel R.D., et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 2002. — Vol. 123. — P. 1132–1140.
- Torres-Padilla M.E., Parfitt D.E., Kouzarides T., et al. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo // *Nature*. — 2007. — Vol. 445, 7124. — P. 214–218.
- Vulliamy T., Marrone A., Goldman F., et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenital // *Nature*. — 2001. — Vol. 413. — P. 432 — 435.
- Ye M., Iwasaki H., Laiosa C.V., et al. Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term multilineage repopulation potential // *Immunity*. — 2003. — Vol. 19. — P. 689–699.
- Zheng G.Z., Li Zhang, Quan Jiang, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 90. — P. 284–288.
- Ziegler B.L., Valtieri M., Almeida-Porada G. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells // *Science*. — 1999. — Vol. 285. — P. 1553–1558.

ГЛАВА 8. ИНДУКЦИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СВОЙСТВ У ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

8.1. Трансдифференцировка соматических клеток *ex vivo* и при трансплантации

Хорошо известно, что соматические клетки животных могут изменять свой фенотип и функцию при помещении в новое окружение. У личинок дрозофил сигнальные диски — структура, не содержащая СК, но предназначенная для образования специфических частей тела взрослой особи, — могут изменить своему предназначению после регенеративных клеточных делений [765]. Этот феномен (он получил название трансдетерминация) имеет место при трансплантации дисковых клеток в новую ткань. В результате такой трансплантации клетки ног личинок могут превратиться в клетки усиков; клетки усиков — в клетки крыльев и т. д. Предполагают, что трансдетерминация обусловлена нарушением регуляции ключевых генов, прежде всего генов *Нох*. Хотя трансдетерминация у дрозофил осуществляется без участия СК, отмечено некоторое сходство между изменением судьбы СК млекопитающих и трансдетерминацией дисковых клеток у насекомых [162]. Во-первых, оба процесса происходят во время регенеративной пролиферации. Во-вторых, в их развитие вовлекаются клетки-предшественники, которые могут дифференцироваться в зрелые эффекторные клетки. В-третьих, изменения судьбы клеток в обоих случаях не приводят к появлению промежуточных типов клеток, а сопровождаются нормальной дифференцировкой. Наконец, гены *Нохs*, вовлекающиеся в трансдетерминацию у дрозофил, экспрессированы также в региональных СК и регулируют их поведение [664].

У головастиков амфибий, а также у цыплят, после ампутации первичных хрусталиков клетки роговицы могут образовать новые хрусталики [цит. 162]. Трансдифференцировка в этом случае контролируется факторами, секретируемыми нейральной сетчаткой. У млекопитающих трансдифференцировка может наблюдаться при эктопической трансплантации клеток. После инъекции эндотелиальных клеток в ткань поврежденного сердца выявляли их трансдифференцировку в сокращающиеся кардиомиоциты [167]. Прогениторные клетки эпителия ПЖ при эктопической трансплантации дифференцировались в гепатоциты [175]. Предполагают, что ключевую роль в изменении судьбы клетки играет микроокружение, включающее экстраклеточный матрикс, ростовые и дифференцировочные факторы и соединения, осуществляющие контакт с ближайшими клетками. Эти же показатели могут влиять на судьбу СК, когда они мигрируют и проникают в другие органы [162].

Трансдифференцировка соматических клеток млекопитающих может также происходить при совместном культивировании их с другими клетками или при изменении условий культивирования. В условиях, вызванных эктопической экспрессией адипогенных факторов транскрипции и способствующих адипогенезу, выявляли трансдифференцировку миобластов в зрелые адипоциты [330]. Индукция транскрипционных факторов печени в клетках ПЖ вызывала конверсию последних в гепатоциты [677]. Подавление щелевых соединений (gap-junction) при культивировании остеобластов приводило к развитию фенотипа адипоцитов [665]. Эндотелиальные клетки эмбрионов крыс или пуповинных вен новорожденных крысят трансдифференцировались в кардиомиоциты, способные к сокращениям, при совместном культивировании их с кардиомиоцитами новорожденных крысят [167]. Примечательно, что эндотелиальные клетки, происходящие из взрослых животных, не подвергались в этой системе трансдифференцировке, предполагая возрастную зависимость пластичности подобного типа [162].

8.2. Эпигенетическое перепрограммирование клеток

8.2.1. Перепрограммирование ядер бесклеточными экстрактами

На современном этапе перепрограммирование ядер дифференцированных клеток большого и плюрипотентные клетки, подобные ЭСК, является одной из главных целей регенеративной медицины. В настоящее время уже известно, что для развития плюрипотентности перепрограммированию ядра соматической клетки должна предшествовать эпигенетическая модификация ядра. В связи с этим большой интерес представляет изучение условий, при которых происходит наиболее успешное перепрограммирование клеток. В экспериментах были интенсивно изучены следующие подходы: перепрограммирование ядра клетки бесклеточными экстрактами; перенос ядра в ооцит; слияние с ЭСК.

Экстракты половых или соматических клеток широко применяются для исследования таких процессов в ядрах клеток, как динамика хромосом и ядерных оболочек [483, Rossia & Collas, 1996], а также перемоделирование хроматина [Kikyo, et al., 2000]. Благодаря тому, что ядра могут быть подвергнуты интенсивной обработке *in vitro*, удастся получить клеточные экстракты, позволяющие изменять экспрессию генов в изолированных ядрах и клетках [162, 287, 288]. В экстрактах содержатся регуляторные компоненты ядер, опосредующие изменение экспрессии генов в геноме клетки-мишени, и компоненты цитоплазмы, способствующие, по-видимому, доставке регуляторных компонентов в ядра. В экстракты добавляются АТФ-регенерирующая система (АТФ, креатинкиназа и фосфокреатин) и ГТФ, также содействующие физиологическому импорту ядерных факторов в экзогенные ядра. Очищенные ядра фибробластов после инкубации с экстрактами Т-лимфоцитов человека [288] или В-клеток инсулинпродуцирующей линии крыс, приобретали способность к транскрипции [287]. По данным авторов [162, 288], стимулирующий экстракт Т-лимфоцитов обеспечивал доставку транскрипционных факторов генов IL-2 в ядра экзогенных фибробластов и вызывал изменение структуры хроматина. Было установлено, что в геноме фибробластов экстракт способствует ацетилированию гистонов H4 в промоторах IL-2. Одновременно методом PCR-RT в ядрах фибробластов, экспонированных со стимулирующим экстрактом, выявляли транскрипцию генов IL-2. Такая методика репрограммирования ядер была исследована на геномах разных типов клеток, как трансформированных, так и первичных. В частности, подобный экстракт, полученный из кардиомиоцитов крысы, вызывал повышение экспрессии маркеров кардиомиоцитов в СК жировой ткани [267]. У 18 % фибробластов, экспонированных с экстрактом нейрональных предшественников (NT2), через 15 дней после репрограммирования выявляли экспрессию белка нейроволокон NF200 [288].

Изучение репрограммирования после обработки цитоплазматическими или ядерными экстрактами Т-лимфоцитов (или клеток других типов) проводили с использованием плазматических мембран первичных фибробластов плодов крыс или фибробластов линии 293Т человека. Предварительно вызывали повышение проницаемости мембран фибробластов путем обработки бактериальным токсином стрептолизин О. Специфические для Т-лимфоцитов (или других клеток) факторы, необходимые для включения специфических генов, диффундировали в фибробласты, обладающие повышенной проницаемостью, и активно поглощались их ядрами. После окончания инкубации клетки обрабатывали ионами кальция. При последующем культивировании было обнаружено появление в клетках свойств Т-лимфоцитов (или других соответствующих клеток), которые после экспозиции с экстрактом сохранялись в течение нескольких недель. Изменение экспрессии генов выявляли анализом тасоarray cDNA спустя 2 недели после перепрограммирования [162, 288]. Обнаруживались изменения экспрессии более чем 120 генов, при этом активность кроветворных генов, в том числе генов IL и рецепторов IL, цитокинов и рецепторов цитокинов, хемокинов и рецепторов хемокинов, а также молекул клеточной поверхности, повышалась, тогда как активность генов факторов роста фибробластов, молекул адгезии и цитоскелетных белков снижалась. Перепрограммированные фибробласты экспресировали также поверхностные рецепторы, специфические для Т-лимфоцитов, включая CD3,

CD4, CD45, TCR и β -субъединицы IL-2R. В течение первых нескольких дней были очевидны морфологические изменения клеток: фибробласты становились более мелкими, округлялись и принимали форму клеток, из которых получали экстракты. Во всех перепрограммированных клетках при стимуляции генами TCR и CD3 обнаруживали синтез цепей IL-2R α , из которых, вероятно, осуществляется сборка высокоавидных функциональных IL-2R. Предполагают также возможность индукции других сложных функций (например, секреторных) в фибробластах, перепрограммированных в другие типы клеток. По данным Nakelien и др. [287], исследующих индуцирующие свойства экстрактов β -клеток крыс, два транскрипта β -клеток (Pdx-1 и проинсулин) определялись в обработанных фибробластах в течение 4-х недель. Этот функциональный аспект особенно важен при рассмотрении вопроса терапевтического использования метода перепрограммирования клеток *in vitro*.

Необходимо отметить, что полного перепрограммирования фибробластов в дифференцированные клетки достичь не удавалось [162, 288]. Изменялась (повышалась или снижалась) экспрессия лишь некоторых генов. Однако для терапевтического клеточного замещения, вероятно, и не обязательно получение полностью перепрограммированных клеток. В частности, для лечения сахарного диабета типа I может быть достаточно получить клетку, обладающую только некоторыми свойствами β -клеток, например, способностью секретировать регулируемое количество инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой. Перепрограммирование *in vitro* может быть применено для лечения многих заболеваний и намечает возможность получения изогенных (аутологичных для больного) клеток для трансплантации. Соматические клетки, применяемые в качестве источника перепрограммированного материала, могут выращиваться в больших количествах и подвергаться трансформации для получения необходимых компонентов. При этом исключаются этические и юридические проблемы, возникающие при использовании клеток из эмбрионов человека.

8.2.2. Перепрограммирование клеток животных путем переноса ядра

Впервые успешный перенос ядра животной клетки осуществили в 1952 г. Briggs и King [118]. Эти авторы сообщили, что после переноса ядер эмбрионов на стадии бластулы в энуклеированные яйца *Rana pipiens* были получены нормальные вылупливающиеся головастики. Позднее достигли успеха в получении фертильных взрослых лягушек после переноса ядер интерстициальных клеток головастика в энуклеированные яйца *Laevis Xenopus* [обзор 285]. При переносе ядер из взрослых соматических клеток образование головастика происходило, но во взрослую стадию они не развивались.

У млекопитающих перенос клеточного ядра более затруднителен вследствие меньших размеров клеток. В 1975 г. Bromhall сообщил о развитии кролика до стадии морулы после переноса ядер клеток морулы в энуклеированные яйцеклетки кролика. Затем появились данные об успешном переносе ядер эмбриональных клеток с получением взрослого потомства у различных видов млекопитающих. Однако долго отмечались затруднения в создании клонированных животных переносом ядер из дифференцированных клеток в яйцеклетки.

В 1996 г. Wilmut и др. [800] создали взрослую овцу, ставшую известной как Долли, применяя ядра из клеток фолликулов. Впоследствии соматическое клонирование было успешно проведено на других видах, таких как корова, мышь, коза, свинья, кошка и кролик [обзор 285]. Hochedlinger и Jaenisch [322] получили мышь из В-лимфоцитов, иммуноглобулины которых подверглись перестройке. Для этого авторам потребовалась двухэтапная стратегия: вначале из клонированных эмбрионов были выделены ЭСК, а затем эти ЭСК были использованы для получения мыши из лимфоцитов, дифференцированных до конечной стадии. Позже наибольших успехов достигали при клонировании животных с использованием ЭСК и НСК [94]. Полученные данные позволили заключить, что общей закономерностью у млекопитающих и амфибий было обратное соотношение между степенью клеточной дифференцировки и возможностью перепрограммирования.

Эффективность клонирования животных путем переноса ядер соматических клеток до сих пор остается очень низкой. Получить жизнеспособную особь можно лишь из небольшого числа (менее 1 %) реконструированных эмбрионов. У животных после переноса ядра отмечают высокую частоту аборт в ранние периоды гестации и повышенную смертность в перинатальном периоде [800]. Однако вначале было неясно, вызваны ли нарушения развития неполным ядерным перепрограммированием или недостатками методики клонирования. Перенос ядра состоит из ряда сложных этапов, включающих культивирование донорских клеток, энуклеацию, инъекцию ядра, слияние, активацию, культивирование реконструированного эмбриона *in vitro* и перенос эмбриона животному-реципиенту. Субоптимальные условия только на некоторых этих этапах могут повлиять на получение клонированных эмбрионов и животных. До настоящего времени полная информация, касающаяся ядерного перепрограммирования при клонировании, отсутствует, хотя многие исследовательские группы по всему миру имеют успешно выращенных клонированных животных.

Однако попытки получения этим методом специфические для человека СК вообще оказались безуспешными. Лишь недавно это удалось осуществить на нечеловекообразных приматах [Byrne et al., 2007]. Применяя перенос ядер фибробластов, эти авторы получили всего 2 линии ЭСК приматов, израсходовав 304 яйцеклетки.

Для восстановления нормального эмбрионального развития ядро дифференцированной клетки, перенесенное в цитоплазму энуклеированной яйцеклетки, должно подвергнуться перепрограммированию [291, 317]. Одним из факторов, влияющих на способность к развитию клонированных эмбрионов, может быть восстановление длины теломеров в хроматине донорских клеток. Известно, например, что укороченные теломеры донорских соматических клеток крупного рогатого скота после переноса ядра восстанавливались до нормальной или даже большей длины [427, 744]. Но первое клонированное животное — овца Долли наследовала от своего донора укороченные теломеры [Shiels et al., 1999]. По заключению Migashita и др. [505], у клонированных животных донорские клетки разного типа имеют различную длину теломеров. Сама методика клонирования или нефизиологическая культуральная среда на отдельных этапах раннего эмбриогенеза могут вызвать несвойственную эпигенетическую модификацию импринтированных генов. Хотя у клонированных эмбрионов быка и мыши не выявили изменений экспрессии генов ферментов обмена, экспрессия других генов, существенных для раннего развития эмбрионов, была аномальной, предполагающей возможность нарушения транскрипции [291].

Первым этапом дифференцировки во время раннего эмбрионального развития у млекопитающих является образование бластоцисты, из которой происходят клетки ВМБ и трофобластодермы (ТЭ). Клетки ВМБ содействуют образованию всех тканей эмбриона и некоторых внеэмбриональных мембран. Позже клетки ТЭ объединяются с внеэмбриональными мембранами, происходящими из ВМБ, и образуют плаценту плода. Обе эти клеточные линии являются жизненно важными как для эмбриона, так и плода [263, 296]. Кроме образования аномальной плаценты, в качестве других причин, влияющих на выживание клонированных эмбрионов, могут быть значительное повышение у них клеток ВМБ, снижение числа клеток ТЭ, аномальная экспрессия в трофобласте генов МНС типа I, резкое снижение уровня метилирования ДНК [291]. Во время эмбрионального развития млекопитающих динамические эпигенетические изменения геномной ДНК являются существенными и уникальными [514, 623, 660]. Для успешного клонирования животных путем переноса ядра вначале необходимо осуществление эпигенетического перепрограммирования дифференцированного состояния донорских клеток в тотипотентное эмбриональное состояние [Gurdon & Colmon, 1999]. Это подразумевает, что должна быть закрыта программа генной экспрессии донорского ядра и восстановлена специфическая программа эмбриональной экспрессии, необходимая для нормального развития. В целом процессы эпигенетического перепрограммирования после переноса ядра соматической клетки включают ремоделирование структуры хроматина, глобальные изменения метилирования ДНК, экспрессию импринтированных генов, восстановление длины теломеров, инактивацию X-хромосом и другие менее значительные процессы [714].

В отличие от крайне низкой эффективности получения клонированных животных, ЭСК химерных мышей могут быть легко получены путем переноса ядер нормальных эмбрионов или клонированных клеток бластоцистов [773]. При обсуждении организационных возможностей получения линий ЭСК человека, специфических для больного, значительной проблемой оказалось получение необходимого количества яйцеклеток человека. Вместе с тем, исследования на мышах показали, что потребности в яйцеклетках можно избежать. Egli и др. [221] установили, что плюрипотентные клетки можно получить путем переноса ядер, используя в качестве донорских клеток соматические клетки взрослых, а в качестве реципиентных клеток — зиготы, т. е. клетки, образующиеся в результате слияния двух половых клеток (гамет). Протокол этих авторов включает задержку зиготы в митозе посредством медикаментозной обработки, удаляющей ее собственные хромосомы и позволяющей заменить их митотическими хромосомами, происходящими от донора. Задержка митоза является важным этапом, так как перенос в интерфазные зиготы неэффективен для ядер донора позже 4-клеточной стадии эмбриона. Применяя этот метод, авторы получили химерные эмбрионы и продемонстрировали возможность перепрограммирования клеток. Но пока успех достигнут только с зиготами мышей.

Было показано, что в перепрограммировании ооцитов лягушек важную роль играют несколько белков. В их число входит ISWI, который включается в обмен белков между перенесенным ядром и цитоплазмой ооцита [372], и Brg1, который необходим для активации Oct-3/4 — фактора транскрипции, специфически экспрессированного в недифференцированных клетках [Nan-sis et al., 2004]. Как ISWI, так и Brg1 являются АТФ-азами, ремоделирующими хроматин. Таким образом, была установлена решающая роль ремоделирования хроматина в перепрограммировании ядра. В обоснование своей новой стратегии Egli и др. [221] заключили, что основное различие между ооцитами и зиготами в качестве потенциальных реципиентов обусловлено тем, что самые необходимые факторы локализуются в ядре на протяжении интерфазы. Во время митоза эти факторы освобождаются и могут содействовать перепрограммированию.

8.2.3. Перепрограммирование путем слияния дифференцированных клеток с ЭСК или ЭЗК

В 1976 г. Miller и Ruddle [508] установили, что у тимоцитов, слившихся с клетками эмбриональной карциномы, выявляются плюрипотентные свойства. Позже подобные же свойства были обнаружены у дифференцированных клеток мышей, подвергнутых электрослиянию с ЭСК мыши [720]. После трансплантации этих клеток мышам nude наблюдали образование тератом, состоящих из тканей всех трех зародышевых слоев, что подтверждало плюрипотентность этих клеток. Недавно появились сообщения о перепрограммировании предшественников миелоидных клеток человека путем слияния их с ЭСК человека [171].

Остается определить, может ли быть полностью перепрограммирован геном соматических клеток? У гибридов тимоцитов и ЭСК регионы промоторов нескольких генов, в том числе Oct-3/4, приобретали эпигенетический статус, подобный статусу ЭСК, подвергшихся ацетилированию гистонов и метилированию ДНК [386]. В результате было заключено, что, по крайней мере, часть генома соматических клеток (timoцитов) перепрограммируется после слияния. Степень такого перепрограммирования соматического генома после слияния с ЭСК можно определить путем анализов экспрессии генов и иммунопреципитации хроматина.

В лаборатории Tada [719] разработали метод избирательного выделения хромосом из гибридных клеток и установили, что удаление хромосом, происходящих из ЭСК и содержащих Nanog — кодирующий фактор транскрипции, важный для плюрипотентности [143, 511], не влияет на плюрипотентность гибридных клеток. Serov и др. [671] изучили свойства гибридных клеток, полученных путем слияния ЭСК мыши линии 129/Ola со спленоцитами, происходящими из взрослых самок мышей DD/c. После культивирования в селективной среде авторы получили клоны гибридных клеток, в которых «плюрипотентные» хромосомы были замещены их соматическими дублями, несущими избранный ген. Такие гибриды ЭСК-соматическая клетка с почти

диплоидным набором хромосом после введения в полость бластоцисты образовывали химеры, а при культивировании в суспензии превращались в эмбрионидные тельца, содержащие ткани всех трех зародышевых листков. Авторы заключили, что гибридные клетки, геном которых формируется после тесного контакта с геномом дифференцированной клетки, продолжают сохранять уникальное свойство эмбрионального генома — плюрипотентность. Но пока не удалось показать сохранение у гибридных клеток полного перепрограммирования (плюрипотентности) после удаления всех хромосом, происходящих из ЭСК. Вряд ли это технически выполнимо, хотя осуществление такой задачи позволило бы приблизиться к решению проблемы отторжения гибридных клеток после их имплантации из-за хромосом, происходящих из ЭСК и кодирующих локусы главного комплекса гистосовместимости (МНС). Предполагают, что в результате можно будет избежать или, по крайней мере, резко снизить реакции отторжения после трансплантации гибридных клеток [321, 816].

Альтернативный метод перепрограммирования соматических клеток путем обработки их экстрактами ЭСК предложили Taranger и др. [726]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе такого перепрограммирования соматических клеток, малоизучены. По одним данным ответственные факторы находятся в ядре [202], по другим — в цитоплазме [695]. Silva и др. [689] выявили значительное увеличение колоний перепрограммированных клеток после слияния НСК с ЭСК, активно экспрессирующими *Nanog*. При сверхэкспрессии *Nanog* ЭСК мыши самообновлялись даже в отсутствие LIF [143, 511]. Сходным образом, при сверхэкспрессии *Nanog* в ЭСК человека наблюдали экспансию последних даже без использования фидерных клеток [178]. У эмбрионов E5.5, не экспрессирующих *Nanog*, выявляли дезорганизацию внеэмбриональных тканей, в которых не обнаруживали эпибласта и примитивной эктодермы [511]. ЭСК без *Nanog* могут быть получены, но в них обнаруживается спонтанная дифференцировка в клетки внеэмбриональной эндодермы. По данным Natano и др. [302], мутантные ЭСК, содержащие гетерозиготный *Nanog*, отличаются нестабильностью и подверженностью к спонтанной дифференцировке. Выключение *Nanog*, опосредованное интерференцией микро-РНК, вызывало дифференцировку ЭСК как мыши, так и человека [344]. Эти данные подтверждают большое значение *Nanog* в индукции и сохранении плюрипотентности.

8.3. Молекулярные механизмы перепрограммирования клеток

В каждой соматической клетке содержится генетическая информация, различно выраженная в зависимости от типа клетки или вида ткани. У эукариотов генетическая информация содержится в ДНК, упакованной вместе с гистонами и негистоновыми белками в хроматин. Ремоделирование структуры хроматина приводит к изменению поступления транскрипционных факторов в места их регуляторного действия. Это, в свою очередь, неизбежно вызывает изменение генной экспрессии. Конкретным проявлением этих процессов могут быть наблюдаемые изменения пролиферации СК и численности клеток-предшественников. Таким образом, структура хроматина и ее ремоделирование являются важными формами контроля генной экспрессии. Изменения хроматина включают метилирование ДНК и ацетилирование гистонов. Образующиеся при этом молекулы обладают способностью влиять на многие клеточные функции, в том числе дифференцировку клеток, динамику клеточного цикла, апоптоз, изменение цитоскелета и ангиогенез. Предполагают, что пластичность СК также связана с ремоделированием ДНК [142].

Гипоацетилированные регионы ДНК, транскрипция в которых не проявляется, подвергаются обычно метилированию. В клетках млекопитающих этот процесс происходит в цитозиновых основаниях динуклеотидных пар CpG ДНК. В геноме эукариотов эти динуклеотиды представлены с низкой частотой. Но имеются места в геноме, так называемые CpG островки, которые характеризуются повышенной частотой этих динуклеотидных пар. Такие островки выявляются внутри генных промоторов и распространены в местах транскрипции. Также они могут обнаруживаться в регионах, удаленных от промоторов. В клетках зародышевых линий островки CpG обычно остаются неметилированными, но в соматических клетках они быстро метилируются.

Гиперметилирование промоторных CpG островков коррелирует с подавлением транскрипции. После метилирования *de novo* CpG островков, находящихся в транскрибированных регионах, экспрессия гена вновь становится возможной (рис. 8.1).

Степень метилирования ДНК определяет уровень ацетилирования гистонов. Метилирование ДНК вызывает нарушение транскрипции, по крайней мере, двумя способами: прямым блокированием связывания транскрипционных факторов с элементами *cis* и непрямым блокированием доступа факторов транскрипции к ДНК ядерными белками и некоторыми гистонами, связывающимися с метилированными элементами. Метилирование ДНК индуцирует деацетилирование гистонов и ремоделирование хроматина, которые приводят к глушению гена репрессорным комплексом транскрипции.

Процессы метилирования ДНК в организме млекопитающих схематически представлены на рис. 8.2.

У млекопитающих паттерны метилирования ДНК устанавливаются во время раннего эмбриогенеза и сохраняются в течение всей жизни. Предполагают, что, благодаря использованию наследственных форм метилирования ДНК, структура хроматина сохраняется в течение многих поколений.

Во время эмбриогенеза сразу после оплодотворения на протяжении одного-двух клеточных делений отмечается резкое снижение уровней метилирования, которое сохраняется до имплантации бластоцисты. Хотя биологическое значение раннего эмбрионального деметилирования остается неясным, этот процесс представляется существенным для устранения различий гаметоспецифических форм метилирования и преобразования генома до инициации нормального развития. После имплантации большая часть геномной ДНК метилируется, тогда как тканеспецифические гены подвергаются деметилированию в тех тканях, в которых они экспрессированы. Деметилирование, распространяющееся по всему геному, сменяется повышением метилирования *de novo*, охватывающим почти все CpG островки и приводящим к дифференцировке клеток. Определенную роль в активации процессов метилирования в отдельных клетках имеет пространственная локализация клеток, которая в свою очередь обуславливает различную клеточную и тканевую дифференцировку.

Деметилирование генома частично осуществляют деметилазы, но наибольшее значение имеет 5-метилцитозинная ДНК-гликозилаза, которая выявляет все полуметилированные места. Метилирование *de novo* (через 2–4 дня после начала дифференцировки) может быть ответственно за глушение тех генов, экспрессия которых снижается. Примечательно, что по многочисленным данным пластичность СК проявляется в процессе культивирования клеток. Для сохранения мультипотентного потенциала МСК и МАРС пассажи и пересевы должны повторяться каждые 3–4 дня. Повторение пересевов вызывает, вероятно, деметилирование генома; и в такой популяции клеток легко индуцируется дифференцировка в любом направлении [142].

В 1982 г. Boyd and Schrader, изучавшие влияние 5-азацитина (деметилирующего препарата) на клетки-предшественники В-лимфомы, трансформированные вирусом Abelson, обнаружили, что часть клеточной популяции приобретает свойства макрофагов, в том числе способность прикрепляться к пластику, проявлять фагоцитарную и эстеразную активности. Обработка 5-азацитином фибробластов человека линии 3Т3 приводила к их дифференцировке в клетки скелетных мышц, хондроциты и адипоциты. Это были первые сообщения о межлинейном переключении. Фенотипические переключения также возможны между такими дифференцированными клетками, как пневмоциты I и II типов. У взрослых клетки обоих этих типов тесно связаны, но отличаются по фенотипу, функциям и морфологии [484]. Так, повреждение легочной ткани часто вызывает гибель и десквамацию клеток типа I и ускоренную трансформацию постмитотических клеток типа II в клетки типа I. Хотя морфологические изменения, сопровождающие образование пневмоцитов нового типа, хорошо изучены, мало известно о молекулярных регуляторных факторах, которые приводят к смене программы дифференцировки клеток типа I. Быструю реверсию фенотипов пневмоцитов можно наблюдать *in vitro* при изменении условий культиви-

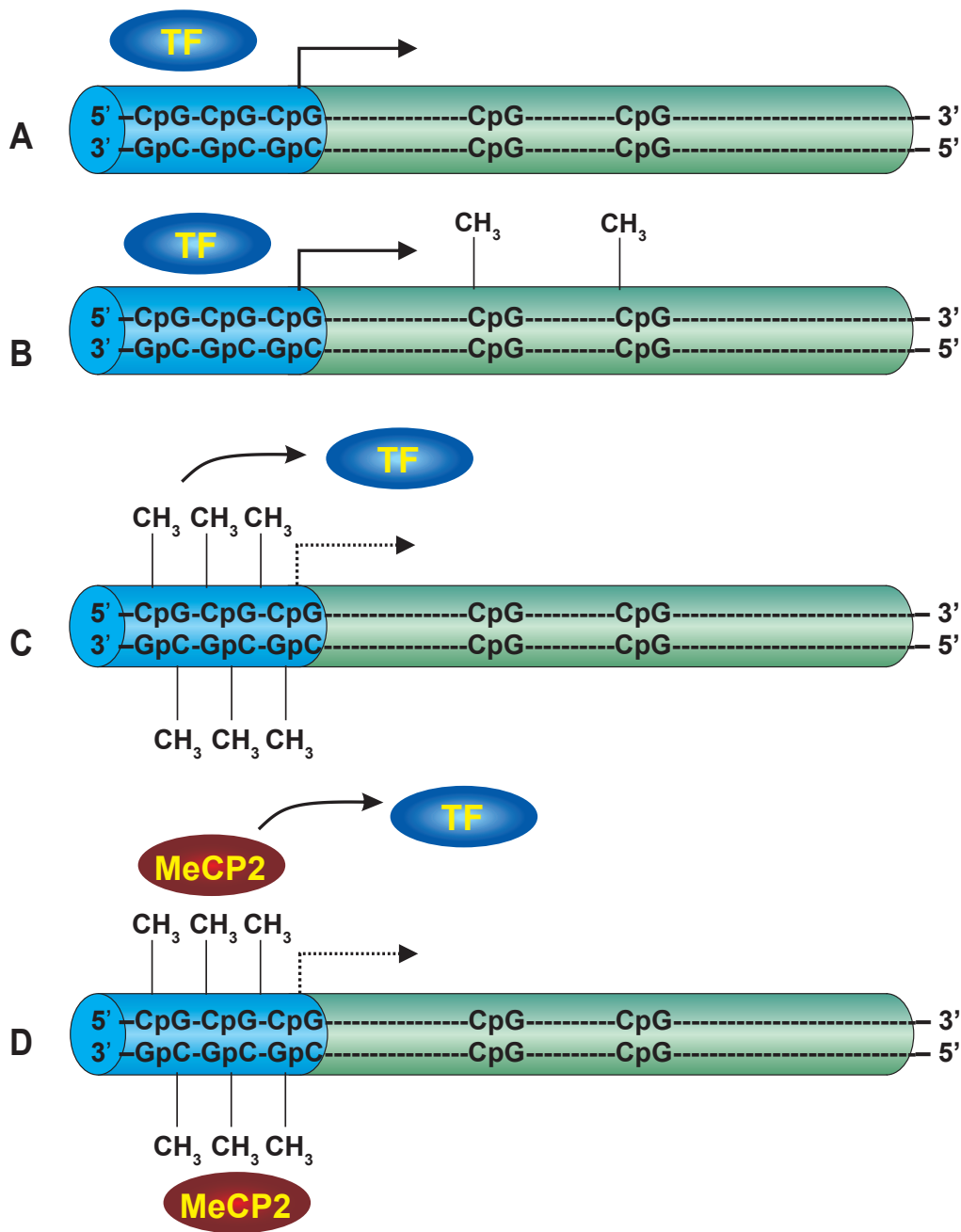


Рис. 8.1. Эпигенетическая регуляция экспрессии гена посредством метилирования ДНК

А) Неметилированный CpG островок промотора. Транскрипционный фактор (TF) связывается с определенным участком ДНК (мишенью) с осуществлением транскрипции гена. В) Неметилированный CpG островок промотора и метилированный CpG островок внутри экзонной ДНК. TF связывается с мишенью в виде участка ДНК с определенной последовательностью и ген транскрибируется. С) Метилированный CpG островок промотора. TF не может связаться с мишенью; и транскрипция гена выключается. D) Метилированный CpG островок промотора. TF блокируется метил-CpG-связывающим белком (MeCP2) и транскрипция выключается. По Cerny and Quesenberry [142].

рования, хотя инициирующий молекулярный процесс, вызывающий переключение программы развития клеток, еще неизвестен. Однако предполагают, что ключевым фактором может быть изменение метилирования ДНК [142]. Специфичность этого процесса могут обеспечивать новые ДНК метилтрансферазы (Dnmt 3a, 3b1, b2, b3), которые во время развития различно представлены и регулируются в некоторых органах, включая легкие [556]. Дополнительным фактором эпигенетической регуляции может также быть интерференция микро-РНК, способными контролировать активность мРНК.

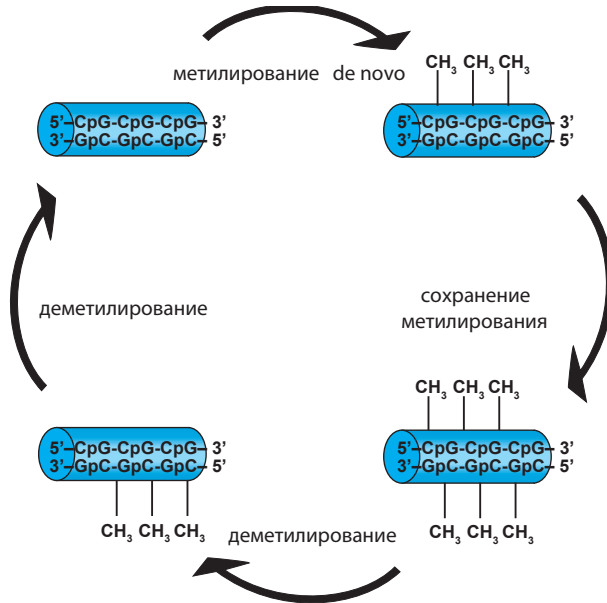


Рис. 8.2. Схема, представляющая процессы метилирования ДНК в организме (по Cerny и Quesenberry [142])

Важную роль в регуляции экспрессии генов играет локальное ацетилирование гистонов. Гиперацетилированный хроматин активен в транскрипции, тогда как гипоацетилированный — подавлен (рис. 8.3), хотя широко распространенное ацетилирование гистонов не обязательно связано с транскрипцией. Отмечается динамическое равновесие между ацетилированием (уровень гистоновых ацетилтрансфераз, HATs) и деацетилированием (уровень гистоновых деацетилаз, HDACs) [142].

До настоящего времени у млекопитающих описаны HDACs трех классов. Ферменты класса I оказывают значительное влияние на гены и соединения, имеющие основное значение в развитии фазы G1-S клеточного цикла. Семейство HDACs класса II объединяет ферменты, молекулярный вес которых в два раза превышает таковой у ферментов класса I. У человека HDAC класса I экспрессированы в различных тканях, тогда как ферменты класса II проявляют тканеспецифический характер экспрессии. Высокие уровни деацетилаз класса II были обнаружены в скелетных мышцах, тканях сердца и мозга, отличающихся низким уровнем пролиферации. Также была отмечена их причастность к транскрипционному глушению генов, ответственных, например, за дифференцировку скелетных мышц. Предполагают, что клетки, утрачивающие пролиферативную способность, теряют HDACs в своих ядрах [142].

Большое семейство NAD-зависимых деацетилаз класса III получило название сиртуины (sirtuins). Это высоконсервативные ферменты, содержащиеся как у прокариотов, так и у эукариотов. Хотя некоторые сиртуины, вероятно, прямо вовлекаются в глушение транскрипции, биологическая функция других сиртуинов остается неизвестной. Так как у дрожжей и человека

некоторые сиртуины локализуются не в ядре, заключили, что эти белки, кроме регуляции транскрипции, могут иметь еще какую-то роль в клетке. Поскольку этим белкам присущи свойства, отличающие их от деацетилаз классов I и II, как, например, NAD-зависимость, предполагают, что они могут связывать глушение хроматина с обменом веществ и, возможно, старением или устойчивостью к таким ингибиторам HDACs, как трихостатины.

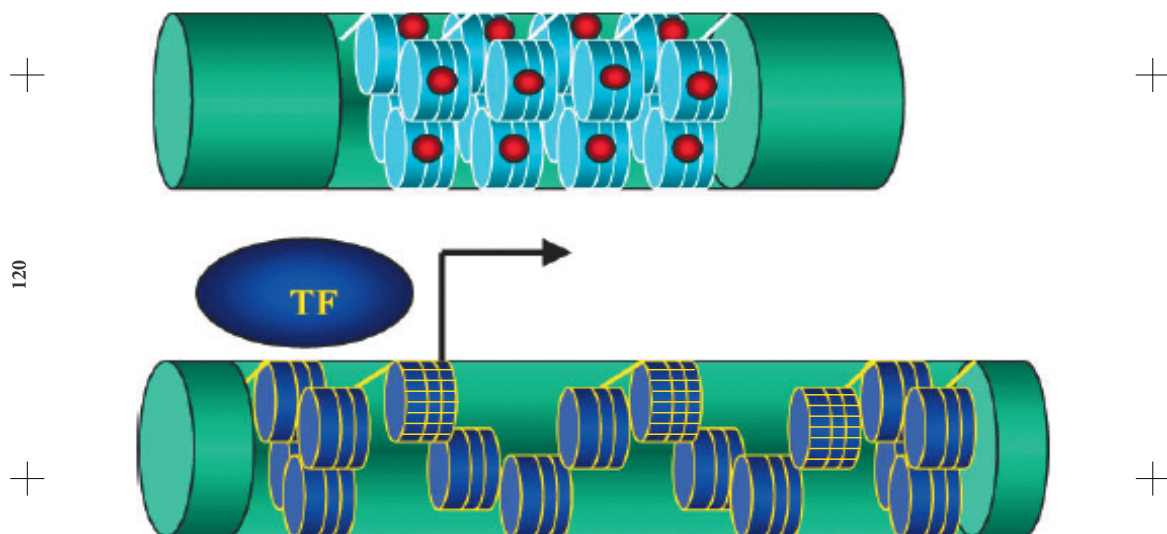


Рис. 8.3. Ацетилирование гистонов и развитие клеточного цикла

А) Фаза G1. Гипоацетилированные гистоны (бледно-голубой цвет). Гены, ответственные за развитие клеточного цикла, не транскрибируются. **Б)** Метилирование ДНК. S фаза цикла: ацетилирование нуклеосом (темно-голубой цвет) вызывает развитие клеточного цикла и приводит, как правило, к транскрипции. TF — факторы транскрипции. По Cerny and Quesenberry [142].

Клинические работы показали, что у человека гиперацилирование гистонов, приводящее к активации некоторых генов, может быть легко и безопасно достигнуто. В связи с этим ингибиторы HDACs стали одним из обещающих классов новых противоопухолевых препаратов, способных индуцировать в раковых клетках конечную дифференцировку, вызвать задержку клеточного цикла в фазе G2M или апоптотическую гибель клеток. Поскольку такие противоопухолевые препараты оказывают влияние на дифференцировку клеток, все сообщения об их действии представляют большой интерес для исследователей, изучающих пластичность СК и биологию трансдифференцировки.

8.4. Контроль транскрипции в регуляции экспрессии генов

Фенотип клеток связан с наличием факторов транскрипции, определяющих характер специфической экспрессии генов. Ряд транскрипционных факторов были признаны главными регуляторами развития различных линий клеток крови. Развитие клеток-предшественников может зависеть от факторов транскрипции, относящихся к основным белкам семейства спираль-петля-спираль (helix-loop-helix, bHLH): Tal-1, Rbtl-2 и др. У наиболее дифференцированных предшественников была выявлена экспрессия белков цинковых пальцев (GATA-1 и др.) или белков других семейств (например, PU.1). Важным фактором пролиферации и выживания некоторых предшественников является белок GATA-2. В связи с тем, что кроветворение во время развития происходит в разных регионах организма, на этот процесс оказывают влияние факторы, ответственные за органоогенез, специфический для каждого отдельного места. Эти факто-

ры представлены генами так называемого гомеобокса (НОХ): например, *НОХВ3*, *НОХВ4* и др. Уровни экспрессии этих генов снижаются по мере дифференцировки.

Транскрипционные факторы являются белками, образующими комплексы и действующими обычно в сочетании. Эти комплексы связываются со специфическими регуляторами нуклеотидной последовательности ДНК, проявляя между собой синергическое или антагонистическое действие. Решающее значение для транскрипционного контроля генетической регуляции имеет опознавание и доступность мест специфической последовательности ДНК. Были изучены паттерны генной экспрессии очищенных популяций самообновляющихся ГСК, их мультипотентных, но самонеобновляющихся предшественников, а также линейных лимфоидных и миелоидных предшественников [Akashi et al., 2003]. Авторы обнаружили наличие у ГСК транскрипционной доступности для осуществления программ множественной дифференцировки как в пределах кроветворной системы, так и вне ее. В клетках-предшественниках экспрессия линейных генов характеризовалась беспорядочностью, которая быстро снижалась при утрате клетками мультипотентности. Авторы предполагают, что у ГСК сохраняется открытая структура хроматина, обеспечивающая мультипотентность, которая подавляется, когда клетки начинают специфическую дифференцировку.

На основании вышесказанного, предполагается изменение структуры хроматина на протяжении всей жизни особи, а также во время ограниченных периодов времени, таких как, например, определенная фаза клеточного цикла. Исходя из этих представлений, было предложено рассматривать СК как относительную сущность, подвергающуюся фенотипическим изменениям, вызванным ремоделированием хроматина [142].

Все клетки организма обладают единым генетическим кодом, который можно легко определить в клетках зародышевой линии и в примитивных клетках. Но с каждым клеточным циклом геном становится менее открытым и менее доступным для факторов транскрипции [Akashi et al., 2003]. Способность клетки проявлять себя в качестве СК является сходной у клеток зародышевых линий и примитивных клеток, но изменяется при ацетилировании гистонов, метилировании ДНК и, возможно, интерференционном воздействии микро-РНК. На молекулярном уровне каждая клеточная особенность или функция находят отражение в коде ДНК, который складывается под влиянием различных внутренних и наружных эпигенетических факторов. Фаза клеточного цикла, экспрессия молекул адгезии и рецепторов цитокинов, длина теломеров и концентрация стимуляторов апоптоза относятся к внутренним факторам «стволовитости». Внешние факторы составляет влияние микроокружения, а также сигналов и факторов регуляции, действующих на уровне всего организма. Они зависят от продолжительности действия повреждающего фактора, типа повреждения (химическое, физическое, механическое и т. д.), экспрессии молекул адгезии, секреции хемокинов и цитокинов. По всей вероятности, может происходить широкое перекрытие внутренних и внешних модуляторов.

Любой клетке в различное время необходимы разные гены, степень экспрессии которых может регулироваться в сторону повышения или снижения. Стимуляция специфической дифференцировки может индуцировать клетку к проявлению свойств клеток других тканей. Возможно, что в различных условиях происходит вовлечение разных типов клеток, так как клетки непрерывно ремоделируют структуру своего хроматина. Cerny и Quesenberry [142] предполагают, что имеются специфические показатели (окна) потенциала СК, реагирующие на изменение структуры хроматина, ацетилирование гистонов и метилирование ДНК. Очень редко клетки могут функционировать как СК с полной эффективностью; более часто такая способность значительно меньше 100 %. Можно также говорить об изменении специфических порогов конверсии СК в различные типы клеток. Каждая клетка обладает разной способностью к «стволовитости» и в определенных условиях может принуждаться макро- и микрофакторами окружения функционировать в качестве СК. Клетка, осуществляющая хоуминг в КМ, но находящаяся в «несоответствующей» фазе клеточного типа, должна израсходовать некоторую часть своей предрасположенности к «стволовитости» на ремоделирование хроматина,

чтобы обеспечить доступ факторов транскрипции к ключевым генам. Поэтому эта клетка подвергнется только кратковременной пролиферации. С другой стороны, клетка, которая начинает деление, но уже обладает надлежащим фенотипом для хоуминга и клеточного цикла, может функционировать как полноценная СК. Тот факт, что каждая клетка обладает отличающимся статусом хроматина, объясняет широкую гетерогенность СК, отмечающуюся во многих экспериментах. СК, функционирующая с низкой эффективностью, может вообще не обнаруживаться из-за биологической гетерогенности системы.

Ремоделирование хроматина имеет, вероятно, большую роль в нормальном развитии и физиологической дифференцировке клеток. Данные о связи генной регуляции с изменением структуры хроматина должны стать основой наших представлений о биологии СК. Теперь, после ознакомления с оптимальными условиями репрограммирования клеток, можно вернуться к работам исследователей по индукции плюрипотентных клеток из дифференцированных клеток млекопитающих, в том числе и человека.

8.5. Индукция плюрипотентности в дифференцированных клетках

Успешное репрограммирование соматических клеток после слияния с ЭСК показало, что в ЭСК содержатся факторы, индуцирующие плюрипотентность. Однако ни работы с переносом ядра соматической клетки, ни эксперименты по слиянию клетки с клеткой не предоставили сведений, какие именно факторы необходимы для индукции плюрипотентности. Две группы исследователей провели скрининг транскрипционных факторов на их способность перепрограммировать соматические клетки. Группа, руководимая Yamanaka [722, 723, 816], изучила способность индуцировать плюрипотентность у 24-х различных факторов и установила, что опосредованное ретровирусом введение в эмбриональные или взрослые фибробласты мышей 4-х факторов транскрипции (*Oct-3/4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*) и селекция для экспрессии *Fbx15* — мишени *Oct-3/4* и *Sox2* — приводит к образованию индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), подобных ЭСК по морфологии, пролиферации и образованию тератом [723]. После введения трех факторов, за исключением *Sox2*, наблюдали появление клеток, подобных ЭСК по морфологии и пролиферации, но не обладающих плюрипотентностью. ИПСК, отобранные по экспрессии *Fbx15*, значительно отличались от ЭСК как по экспрессии генов, так и по характеру метилирования ДНК. Эти данные показали, что полное репрограммирование ИПСК, отобранных по гену *Fbx*, не происходит.

В других работах [472, 557, 793] сообщили о получении ИПСК, используя более строгий маркер селекции — *Nanog*. В одном случае при этом удалось продемонстрировать передачу свойств зародышевой линии потомкам мыши [557]. Хотя *Fbx15*, как и *Nanog*, является мишенью *Oct-3/4* и *Sox2*, первый не обязателен для индукции плюрипотентности, тогда как *Nanog* имеет основное значение. ИПСК, отобранные по *Nanog*, почти не отличались от ЭСК по экспрессии генов, метилированию ДНК и модификации гистонов [472, 793].

Во всех этих работах тщательное внимание обращалось на соблюдение всех условий, обязательных для выявления пластичности. Первоначально авторы [722, 723] на мышах разработали систему, в которой индукция плюрипотентного состояния клеток определялась по развитию у них резистентности к антибиотику неомицину G418. Это достигалось слиянием генов β -галактозидазы и резистентности к неомицину. Полученную кассету связанных локусов (β -geo) путем гомологичной рекомбинации встраивали в гены мышей *Fbx15*. Гены этих локусов, специфическую экспрессию которых можно наблюдать в ЭСК и у ранних эмбрионов мышей *Fbx15*, не являются необходимыми для дальнейшего развития мыши или сохранения плюрипотентности клеток. ЭСК мышей, гомозиготных по β -geo (*Fbx15* β geo/ β geo), были резистентны к крайне высоким концентрациям неомицина (до 12 мг/мл), тогда как соматические клетки, происходящие из мышей *Fbx15* β geo/ β geo, были чувствительны к нормальной концентрации этого антибиотика (0,3 мг/мл). Эти факты позволили предположить, что даже частичная активация локуса *Fbx15* даст результатом появление резистентности к нормальным концентрациям неомицина G418.

Авторы отобрали 24 гена, кодирующих факторы, с которыми могло быть связано сохранение основных свойств ЭСК и индукция плюрипотентности в соматических клетках. Эти гены вводили путем ретровирусной трансдукции в фибробласты эмбрионов мышей Fbx15^{β-geo/β-geo}. Трансдуцированные клетки культивировали на фидерном слое клеток линии STO со средой для ЭСК, содержащей 0,3 мг/мл неомицина G418. После одновременной трансдукции всех 24-х генов-кандидатов получили более двух десятков колоний, устойчивых к неомицину G418. Некоторые из этих колоний имели морфологию и пролиферативные свойства такие же, как у ЭСК. Авторы обозначили клетки этих колоний как iPS-MEF24 (индуцируемые 24-мя факторами плюрипотентные СК из мышечных эмбриональных фибробластов; ИПСК-МЭФ24). Колонии, резистентные к G418, не образовывались при удалении из общего пула индуцирующих факторов Oct3/4 или Klf4. При удалении из пула факторов Sox2 или c-Myc содержание таких колоний значительно снижалось или изменялась их морфология. Удаление остальных факторов не влияло на число колоний. Авторы заключили, что Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc играют главнейшую роль в образовании ИПСК из МЭФ. С помощью PCR-RT авторы установили, что клоны ИПСК-МЭФ4 экспрессировали большинство маркерных генов ЭСК. Клетки этих клонов показывали положительные реакции на ЦФ и SSEA-1 и высокую активность теломеразы. Эмбрионидные тельца (ЭТ), выращенные *in vitro* из ИПСК-МЭФ4, прикреплялись ко дну культуральной чашки и инициировали дифференцировку. Спустя 3 дня иммуноокрашиванием выявляли клетки положительные на α-ГМА (маркер мезодермы), α-фетопротейн (маркер эндодермы) и ВШТубулин (маркер эктодермы). После подкожного введения клеток некоторых клонов ИПСК-МЭФ иммунодефицитным мышам *pude* обнаруживали образование тератом.

Авторы также показали возможность образования описанным выше методом ИПСК из фибробластов, выделенных из кончика хвоста взрослых мышей гибридов Fbx15^{β-geo/β-geo}/C57BL6-129, конститутивно экспрессирующих GFP. Клоны этих ИПСК также экспрессировали на высоких уровнях большинство маркерных генов ЭСК и на более низких уровнях — остальные гены. После введения микроинъекцией клеток этих клонов в бластоцисты мышей C57/BL6 получили 18 эмбрионов (E13, 5), содержащих GFP-позитивные клетки в тканях всех 3-х зародышевых листков. Выявили *in vitro* дифференцировку ИПСК, возникших из фибробластов кончика хвоста взрослых мышей, в ткани всех трех зародышевых листков.

С применением тех же самых 4-х транскрипционных факторов (Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc), но при оптимизации ретровирусной трансдукции, были получены ИПСК из фибробластов кожи и синовиальной ткани взрослого человека, а также клеток линии BJ, полученной из фибробластов новорожденного. Примерно 10 колоний ИПСК авторы получали из каждой 5×10⁴ трансдуцированных фибробластов. По морфологии, кариотипу, пролиферативной активности, поверхностным антигенам, генной экспрессии, активности теломеразы и дифференцировочной способности ИПСК человека были подобны ЭСК. В частности, авторы при изучении *in vitro* направленной кардиогенной дифференцировки ИПСК человека уже через 12 дней после индукции наблюдали появление сокращений клеточных конгломератов. С применением PCR-RT была выявлена в этих клетках экспрессия таких маркеров кардиомиоцитов, как тропонин Т типа 2, фактор энхансер 2С миоцитов (MEF2C), легкий регуляторный полипептид 7 миозина (MYL2A), тяжелый полипептид 7 миозина и транскрипционные факторы MYHCB и NK2, связанные с кардиомиоцитами. На основании результатов своих исследований [722, 723] авторы заключили, что фундаментальная транскрипционная сеть, управляющая плюрипотентностью, является общей у человека и мыши, но внешние факторы и сигналы, поддерживающие плюрипотенцию, уникальны у каждого вида.

В исследованиях, которые были проведены на втором поколении ИПСК мышей, было показано, что после введения этих клеток в бластоцисты мышей они содействовали у получаемых взрослых животных всем типам тканей, включая сперму и ооциты [472, 793]. Одному коллективу удалось получить плод мыши, полностью происходящий из ИПСК, что является ключевым критерием ЭСК [793].

Анализируя эти новейшие данные, следует отметить, что механизм индукции транскрипционными факторами плюрипотентности в соматических клетках пока не полностью ясен. Функция Oct3/4 и Sox2 как главнейших факторов, определяющих плюрипотенцию, хорошо известна [115, Tanaka et al., 2002]. Они синергично повышают в ЭСК как мыши, так и человека экспрессию генов «стволовитости», одновременно подавляя гены, обуславливающие дифференцировку. Но связывать всю проблему только с этими генами вряд ли будет правильно, из-за наличия других подавляющих механизмов, таких как метилирование ДНК и модификация гистонов. Японские авторы предполагают, что c-Myc и Klf4 могут модифицировать структуру хроматина таким образом, что Oct3/4 и Sox2 получают возможность связываться со своими мишенями [816]. Кроме того, Klf4 может взаимодействовать с гистоновой ацетилтрансферазой p300 и регулировать транскрипцию генов, модулируя ацетилирование гистонов [722].

Только небольшая часть фибробластов человека подвергается трансдукции 4-мя ретровирусами, приобретая свойства ИПСК. Низкая эффективность индукции может быть связана с тем, что приобрести свойства плюрипотентных СК могут только те клетки, которые экспрессируют все 4 фактора в необходимой концентрации. Кроме того, возможно, что популяция предшественников нуждается еще в дополнительных минорных хромосомальных изменениях, развивающихся спонтанно при действии некоторых факторов, хотя выявить эти изменения не удалось. Более детальный анализ ИПСК должен помочь выяснить роль транскрипционной регуляции в образовании плюрипотентных клеток. Но при этом надо помнить, что ИПСК человека подобны, но не идентичны полностью ЭСК (анализ DNA microarray).

Еще до того, как японские ученые опубликовали результаты своих исследований, американские исследователи, возглавляемые Thomson J.A., провели скрининг 14 генетических факторов, связанных с развитием эмбрионов, на наличие индуцируемой плюрипотентности [832–834], применяя только клетки человека. В основу этой работы было положено наблюдение, что ЭСК человека перепрограммируют кроветворные клетки при слиянии с ними [834]. Проверялись сочетания факторов, содержащихся в повышенных количествах в ЭСК и соматических клетках человека. Американская группа исследователей установила, что для перепрограммирования клеток человека достаточны факторы транскрипции Oct4, Sox2, Nanog и Lin28, причем первые два являются существенными, а другие два — значительно (Nanog) или умеренно (Lin28) влияющими на эффективность перепрограммирования. Присутствие Oct4, Sox2 и Nanog было явно достаточным, даже в отсутствие Lin28, для перепрограммирования фетальных, неонатальных и взрослых клеток человека. Klf4 и c-Myc не были включены в исследования этой группы, в связи с тем, что оба этих гена не содержатся в повышенном количестве в ЭСК человека.

В августе 2010 года появились сведения еще об одной группе американских ученых, работающих в Университете Сан-Франциско (Калифорния) под руководством профессора Deebak Srivastava, которые добились успеха в попытке перепрограммировать фибробласты мышей в кардиомиоциты с применением всего трех генов: Gata4, Mef2c и Tbx5. Особенности экспериментального подхода этих ученых заключаются в том, что ими были использованы сердечные фибробласты, которые подвергали генетической обработке для получения сердечной мышцы, способной к осуществлению сокращений и образованию электрических связей. Вначале были идентифицированы 14 генов, которые были особенно активны в мышечных клетках сердца. С помощью вируса эти гены доставлялись в сердечные фибробласты. Затем гены по одному удалялись из клеток, пока в них не остались три гена, которые во взаимодействии могли превратить фибробласты в подобие зрелых мышечных клеток. Ученые вводили фибробласты, содержащие три отобранных гена, в сердца мышей. В течение 2-х недель фибробласты превращались в мышечные клетки сердца, которые были способны к установлению связей с другими сердечными клетками и переносили электрические сигналы. На следующем этапе ученые будут пытаться определить вещества, которые смогут заменить гены, применяемые для перепрограммирования фибробластов.

Появились также данные о получении ИПСК человека в Европе, осуществленном с использованием американского протокола репрограммирующих факторов, т. е. с применением факторов Oct4, Sox 2, Nanog и Lin28 [цит. 46]. Особенность данной работы заключается в применении партеногенеза для получения ЭСК из яйцеклетки обезьяны и последующего использования межвидового переноса ядра соматической клетки (iSCNT) для образования иммуносовместимых ЭСК человека [Beyhan, et al., 2007]. Для осуществления партеногенеза у яйцеклетки обезьяны путем обработки химическими препаратами вызывали имитацию оплодотворения. Было установлено, что этот процесс приводит к получению нежизнеспособных эмбрионов, которые не могут развиваться в полноценный организм, но образуют ЭСК. Ядро соматической клетки человека, трансплантированное в яйцеклетку приматов, активированную партеногенезом и культивированную до стадии бластоцисты, обеспечивало получение иммуносовместимых ЭСК человека без потребности в ооцитах или эмбрионах человека.

Учитывая значение и перспективы применения ИПСК целесообразно более подробно описать генетические факторы, обладающие способностью индуцировать плюрипотентность дифференцированных клеток млекопитающих.

Oct-3/4. Этот фактор имеет большое значение для получения и сохранения ЭСК [587]. Он был идентифицирован как белок семейства Oct, специфически экспрессированного в ЭСК, ранних эмбрионах и зародышевых клетках. Факторы транскрипции семейства Oct содержат домен POU и включают приблизительно 150 аминокислот. Oct-3/4 и другие белки POU связываются с октамерной последовательностью (ATTA/TGCAT). Экспрессия Oct-3/4 выявлена в бластомерах развивающегося эмбриона мыши, ВМБ, эпибластных и зародышевых клетках [537]. Этот фактор также экспрессирован в плюрипотентных СК, включая ЭСК, ЭЗК, клетки эмбриональной карциномы и СК зародышевых линий. У человека экспрессия Oct3/4 является характерным признаком ЭСК и ее снижение приводит к дифференцировке клетки и экспрессии маркеров трофобласта [540].

Эмбрионы с нулевой экспрессией Oct-3/4 погибают *in utero* во время периимплантационных стадий развития [цит. 816]. Хотя такие эмбрионы способны достичь стадии бластоцисты, в культуре *in vitro* из ВМБ гомозиготных мутантов образуются только трофобласты. ЭСК из бластоцистов, не экспрессирующих Oct-3/4, не образуются. В ЭСК как мыши, так и человека подавление Oct-3/4 приводило к спонтанной дифференцировке в трофобласты [539, 540]. Эти данные свидетельствуют о существенной роли Oct-3/4 в сохранении плюрипотентности.

Установлено также большое значение Oct-3/4 в содействии дифференцировке. 50 %-ное увеличение содержания этого белка в ЭСК мыши вызывало спонтанную дифференцировку в примитивную энтодерму и мезодерму [540], которая соответствовала временному увеличению экспрессии Oct-3/4 во время первичной стадии дифференцировки примитивной энтодермы из ВМБ. Выявлена также роль Oct-3/4 в нейральной и сердечной дифференцировке ЭСК мыши. Таким образом, в ЭСК мыши уровень экспрессии Oct-3/4 является важной детерминантой клеточной судьбы.

По данным Hochedlinger и др. [322], активация Oct-3/4 в эпителиальных клетках желудка приводит к диспластическому росту, который зависел от продолжительности экспрессии этого транскрипционного фактора. В зонах диспластических поражений выявлялась экспансия прогениторных клеток и повышенная транскрипционная активность β-катенина. В кишечнике экспрессия Oct-3/4, подавляя клеточную дифференцировку, также вызывала дисплазию. Эти данные показывают, что специфические прогениторные клетки взрослых сохраняют способность реагировать на ключевые эмбриональные сигналы, но также могут быть движущим фактором опухолегенеза.

Sox2. Белки Sox имеют сходную последовательность связывания — A/TA/TCAAA/TG. Домен этих белков относится к ДНК-связывающим доменам, сохраняющимся в белках хромосом. Подобно Oct-3/4, Sox2 маркирует плюрипотентные линии ранних эмбрионов мышей и экспрессирован во ВМБ, эпибласте и зародышевых клетках. В отличие от Oct-3/4, Sox2 также выявляется в мультипотентных клетках внеэмбриональной эктодермы. Кроме того, экс-

прессия Sox2 отмечена в некоммутированных делящихся прогениторных и стволовых клетках ЦНС [цит. 816]. Подобно Oct4, экспрессия Sox2 в ЭСК должна поддерживаться на определенном уровне. Экспрессия, выходящая за пределы этого уровня, приводит к дифференцировке ЭСК [241, Kopp et al., 2008].

Эмбрионы с нулевой экспрессией Sox2 погибают во время имплантации вследствие нарушения развития эпибласта (примитивной эктодермы). Гомозиготные мутантные бластоцисты имеют нормальную морфологию, но при культивировании бластоцистов *in vitro* недифференцированные клетки не пролиферируют, и образуются только клетки трофоэктодермы и примитивной эндодермы. Таким образом, подобно Oct-3/4, Sox2 существенен для сохранения плюрипотентности.

Белки Sox регулируют обычно свои собственные гены-мишени, связываясь со специфическими генами-партнерами. Sox2 образует гетеродимер с Oct-3/4 и синергеном регулирует Fgf4, UTF1 и Fbx15. Кроме того, сообщали о сочетанном действии Sox2 и Oct-3/4 в регуляции самих Sox2 и Oct-3/4, а также Nanog. При анализе хроматина методом иммунопреципитации установили, что Oct-3/4, Sox2 и Nanog имеют много общих генов-мишеней в ЭСК мыши и человека [816].

с-Мус. Один из первых протоонкогенов, обнаруженных в раковых клетках человека. Посредством своего домена, расположенного на С-конце цепи, белок Мус связывается с белком-партнером Мах. Димеры Мус-Мах связываются с последовательностью ДНК (CACA/GTG), которая представляет часть общей последовательности Е бокса, связывающего все основные белки типа спираль-петля-спираль (bHLH). Кроме связывания с ДНК, С-конец Мус также вовлекается в трансактивацию путем связывания с СВР и р300, обладающими активностью ацетилазы гистонов.

Эмбрионы мышей, гомозиготных по белку с-Мус, погибают между 9,5 и 10,5 днями гестации. Патологические нарушения выявляются в сердце, перикарде, нейральной трубке. Летальность эмбрионов с-Мус^{-/-} связана с глубокими дефектами васкулогенеза и примитивным эритропоэзом. В ЭСК мышей с-Мус^{-/-} обнаруживаются нарушения дифференцировки сосудов [816].

Наибольшее удивление вызывают данные, показывающие, что *in vivo* в геноме клеток человека выявляется до 25000 мест связывания с-Мус [234, 452], причем только небольшая часть этих участков обнаруживается в последовательности CACA/GTG. Чаше наблюдается мобилизация димеров Мус-Мах через взаимодействие с другими факторами транскрипции, такими как Miz1, в различных местах генома [Peukert et al., 1997]. Связываясь с этими многочисленными местами с-Мус могут модифицировать структуру хроматина и регулировать экспрессию некодирующих микро-РНК, вызывающих интерференцию [Кноерфлер et al., 2006; 547]. При сверхэкспрессии с-Мус в ЭСК мыши может происходить их самообновление, независимое от LIF, но сверхэкспрессия с-Мус в ЭСК человека приводит к гибели клетки или дифференцировке [138]. Отчасти удивительно, что экспрессия с-Мус улучшает эффективность получения ИПСК человека. Возможно это связано с тем, что с-Мус способствует репрограммированию соматических клеток человека благодаря способности управлять делением клеток.

Klf4. Фактор транскрипции Klf4 принадлежит к белкам Kruppel, последовательность аминокислот которых такая же, как у регулятора Kruppel эмбрионов дрозофил (см. главу 4). Высокую экспрессию Klf4 обнаруживают в дифференцированных постмитотических эпителиальных клетках кожи и ЖКТ. Экспрессия этого белка выявляется также в фибробластах и недифференцированных ЭСК мыши.

Установлена возможность функционирования Klf4 в качестве опухолевого супрессора и онкогена. В культивированных клетках повышенная экспрессия Klf4 приводит к подавлению синтеза ДНК и клеточного цикла. Эмбрионы с нулевой экспрессией Klf4 развиваются нормально, но новорожденные мыши погибают в течение 15 часов с проявлениями нарушенной дифференцировки в коже и кишечнике. Индукция Klf4 в базальных кератиноцитах блокирует переключение пролиферация-дифференцировка и инициирует дисплазию чешуйчатого эпителия [242].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе функции Klf4, были частично объяснены Rowland и др. [649]. Эти авторы показали, что при эктопической экспрессии Klf4 наблюдается подавление пролиферации клеток, но выключение только одного гена-мишени *p21* достаточно, чтобы снять цитостатический эффект Klf4. В клетках с нулевой экспрессией *p21* Klf4 способствует клеточной пролиферации, снижая экспрессию *p53*. Следовательно, *p21* может функционировать в качестве гена-переключателя, определяющего результат сигнала Klf4 [650].

При инактивации STAT3 в ЭСК мыши наблюдали снижение экспрессии Klf4, тогда как при повышенной экспрессии Klf4 отмечали активацию самообновления клеток, независимую от LIF [цит. 816]. Кроме этого, сообщали о кооперации Klf4 с Oct-3/4 и Sox2 для активации промотора Lefty1 в ЭСК мыши [533].

Nanog. Это гомеодомен, несущий транскрипционный фактор. Его экспрессия, также как Oct4, быстро снижается при дифференцировке ЭСК [143, 511]. Но в отличие от Oct4 сверхэкспрессия Nanog в ЭСК мыши позволяет им самообновляться независимо от LIF/STAT3. Сверхэкспрессия Nanog также благоприятствует независимому от фидерных клеток росту ЭСК человека и улучшает их клональную эффективность [178]. Оба эти свойства способствуют успешному получению клона ИПСК. Снижение экспрессии Nanog как в ЭСК мыши, так и человека предрасполагает к дифференцировке в экстраэмбриональные линии [143, 511], но обязательная экспрессия Nanog не требуется для плюрипотентности ЭСК, так как и в его отсутствие ЭСК могут сохранять способность к самообновлению [143]. Из перечисленных транскрипционных факторов последние три фактора, кроме регуляции своей собственной транскрипции, могут также активировать или репрессировать экспрессию многих других генов, включая транскрипционные факторы, важные в развитии [Cawley et al., 2004; 417].

Локус **Lin28** был идентифицирован как место связывания в геноме Oct4, Sox2 и Nanog [114]. В связи с этим предполагается, что эти три репрограммирующих фактора могут индуцировать экспрессию Lin28, а при соответствующих уровнях индукции осуществлять репрограммирование в его отсутствие. Недавно было показано, что Lin28 блокирует процесс дифференцировки, индуцируемый микроРНК. Уровни экспрессии Lin28 являются критическими в опытах репрограммирования, так как при высоких уровнях экспрессии он токсичен [837].

8.5.1. Предполагаемый механизм действия факторов транскрипции в индукции плюрипотентности соматических клеток

ЭСК и другие плюрипотентные СК во многих аспектах подобны опухолевым клеткам. ЭСК также бессмертны и быстро пролиферируют. При трансплантации иммунодефицитным мышам они образуют опухоли — тератомы. Плюрипотентные СК являются, в некотором смысле, клетками, трансформированными к обратному развитию. Трансформация происходит во время культивирования *in vitro* или в первичных эмбриональных клетках (ВМБ для ЭСК и примордиальных зародышевых клетках для ЭЗК). Во время этого процесса отмечается активация некоторых генов, таких как *E-Ras* [721], которые превращают ЭСК и ЭЗК в клетки, отличающиеся от их предшественников.

Принимая эти рассуждения, предполагают [816], что индукция плюрипотентных клеток из соматических клеток также начинается с трансформации двух генов, имеющих связь с опухолями — *c-Myc* и *Klf4*. Белки Мус могут вызывать различные трансформации [45], а в первичных фибробластах они также вызывают апоптоз, зависимый от *p53*. Поэтому требуется Klf4 для подавления апоптоза, вызванного *p53* и *c-Myc* [649]. Klf4, в свою очередь, активирует *p21* и подавляет пролиферацию. Этот цитостатический эффект Klf4 может смягчить действие с-Мус, подавляя *p21*. Таким образом, баланс между с-Мус и Klf4 может играть решающую роль в процессе трансформации соматических клеток в плюрипотентные клетки.

Предполагают также, что функция с-Мус не ограничивается индукцией клеточной трансформации. Плюрипотентные СК имеют открытую и активную структуру хроматина [500]. Белки Мус, вероятно, разрыхляют структуру хроматина соматических клеток, вступая в соединение

с множественными местами связывания по всему геному и мобилизуя комплексы гистоновых ацетилаз [Knoepfler et al., 1996]. В соответствии с этой моделью даже в частично репрограммированных соматических клетках обнаруживаются гиперацетилированные гистоны в регионах промоторов ряда специфических для ЭСК генов [723].

Повышенная экспрессия таких факторов как *c-Myc* и *Klf4* может привести не к образованию плюрипотентных клеток, а к появлению опухолей. Но, вероятно, *Oct-3/4* влияет на судьбу клеток, предотвращая их превращение в опухолевые клетки и направляя развитие по пути клеток, подобных ЭСК. Влияние *c-Myc* на структуру хроматина дает возможность *Oct-3/4* активировать или подавить соответствующие гены-мишени. Но одного *Oct-3/4* недостаточно, чтобы индуцировать плюрипотентность. Требуется также *Sox2*, чтобы синергично активировать многочисленные гены-мишени. Дополнительно *Klf4* может функционировать как кофактор *Oct3/4* и *Sox2* [533]. В одной из последних работ было показано, что три фактора (*Oct4*, *Sox2* и *Klf4*) достаточны для того, чтобы вызвать репрограммирование соматических клеток мыши и человека, но со много более низкой эффективностью, чем при добавлении к этим факторам *c-Myc* [530]. По данным Boyer и др. [114], *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*, кроме регуляции своей собственной активности, активируют или репрессируют экспрессию многих других генов, в том числе важных в развитии факторов транскрипции.

Эффективность перепрограммирования плюрипотентных клеток из соматических клеток является ключевой проблемой. Стать индуцируемыми клетками могут менее 0,1 % клеток, включивших все 4 ретровируса, несущие необходимые факторы транскрипции. По мнению Yamanaka [816], это связано с тем, что индуцируемые плюрипотентные клетки, возможно, происходят из редких региональных стволовых и прогениторных клеток, находящихся в культуре фибробластов. Также не исключается, что кроме 4-х вышеназванных факторов ретровирусным включением должны активироваться еще дополнительные факторы. В числе таких факторов могут быть белки поликомба, которые имеют большое значение в сохранении плюрипотентности [115], а также другие факторы, способные ремоделировать структуру хроматина, например, такие как *ISWI* [381] и *Brg1* [Hansis et al., 2004]. Выявление недостающих факторов может обеспечить более эффективную генерацию индуцируемых плюрипотентных соматических клеток. Альтернативно, индукция таких клеток может зависеть от концентраций и характера экспрессии 4-х главных факторов, оптимальное содержание которых достигается, вероятно, только в некоторых трансформированных клетках. В то же время следует учесть, что при избытке *Oct-3/4* плюрипотентность может нарушаться [540]. Большое значение может также иметь баланс между *c-Myc* и *Klf4*.

В отличие от японских авторов, Yu and Thomson [833] полагают, что происхождение ИПСК не связано с региональными СК, находящимися в культуре соматических клеток. В качестве доказательства они приводят данные, что ИПСК, выделенные из печени, происходили из клеток, экспрессирующих альбумин [64]. Также имеются сообщения о получении ИПСК из β -клеток островков Ланганса [710] и зрелых В-лимфоцитов [289]. Предполагают, что повышение эффективности репрограммирования может быть достигнуто расширением спектра действующих генов и включением дополнительных факторов, таких как *TERT*, *T*-гены, некоторые специфические транскрипционные факторы соматических клеток (подобные, например, снижающим уровень *Rax5* в зрелых В-лимфоцитах) [293, 478].

8.5.2. Перспективы применения индуцируемых плюрипотентных клеток

В связи с тем, что трудно получить специфические для больного или для его заболевания СК, которые требуются для эффективной клеточной терапии, большой интерес представляют методы, позволяющие разрешить эту проблему. К таким методам можно отнести индукцию плюрипотентного состояния в дифференцированных клетках с помощью генетических протоколов, предоставляющих доступным клеткам человека способность превратиться в необходимую ткань, подобно тому, как это можно сделать с ЭСК. Не открывают ли представленные работы

новую эру в медицине, когда собственными индуцированными клетками больного можно будет вылечить тяжелое заболевание сосудов, сердца, легких, почек, исправить повреждение сустава или спинного мозга, воссоздать утраченный орган, восстановить потерянную функцию? Если метод по созданию плюрипотентных клеток будет усовершенствован, можно будет получать клетки больного для исследования *in vitro* эффективности лечения болезни на его же собственных клетках, выращенных в культуральных сосудах. В других случаях клетки больного можно будет должным образом перепрограммировать и вырастить в ткань, которая будет трансплантироваться больному без опасения иммунного отторжения. Индуцированные плюрипотентные СК, специфические для больного или его заболевания, можно будет использовать для изучения механизмов заболеваний, лекарственного скрининга, токсикологии.

Для этой методики не нужны эмбрионы, также как яйцеклетки человека. Консультирующий профессор Станфордского Университета США Hurlbut W., член Президентского комитета по биоэтике, заявляет, что исследования по перепрограммированию клеток «существенно изменяют состояние с проблемами СК в повестке дня. С этой технологией мы не собираемся сражаться»*. В течение многих лет профессор Hurlbut был оппонентом клонирования и разрушения эмбрионов человека. Профессор I. Wilmut, руководивший работой по созданию овцы Долли, заявил, что он прекращает работы по клонированию, чтобы освоить новую технологию. Но другой пионер исследований СК Lanza R. говорит, что он встревожен заявлением Wilmut и обеспокоен, что новые работы, как цунами, поглотят все другие исследования СК. «Эта работа представляет громадную научную веху, биологический эквивалент первого аэроплана братьев Райт. Она немного похожа на превращение свинца в золото. Но крайне важно воспринять эту информацию с осторожностью». Lanza R. заявил, что будет продолжать свои исследования по методике получения СК из эмбрионов человека без разрушения самих эмбрионов. По словам доктора Яаманака, методика, разработанная его лабораторией, позволит создавать клетки спермы и яйцеклетки. «Очень полезно получить сперму для мужчины, у которого проблемы с бесплодием». Доктор Яаманака заверяет, что он чувствует серьезную ответственность за разрабатываемую технологию. «Моя цель,— говорит он,— избежать этических проблем, но новые этические проблемы могут возникнуть. Поэтому я буду просить японское правительство не допускать злоупотреблений с данной технологией».

Наибольшие опасения вызывает применение вирусов как средств доставки генов в индуцируемые клетки. По словам профессора Lanza R., «...администрация по средствам питания и лекарствам (Food and Drug Administration) никогда не позволит применять модифицированные вирусом клетки на больных». Доктор Yu из Национального Центра приматов (Висконсин) подтверждает, что вирусный метод доставки генов для клинического применения действительно может получить красный (запрещающий) сигнал, но выражает надежду, что альтернативные способы доставки генов станут доступными в будущем. «Ряд коллективов уже работают в этом отношении»,— добавляет она. Но даже исследователи, первые начавшие работы по индукции плюрипотентности у дифференцированных клеток, предостерегают, что такого метода лечения может не быть еще в течение ряда лет. В опубликованных работах они указывают, что еще много данных необходимо отработать на ЭСК человека. «Не время считать, что исследования на ЭСК человека отмирают»,— говорит профессор Thomson J., возглавляющий коллектив американских исследователей из Университета штата Висконсин. Ему вторит профессор Yamanaka Sh., руководитель японского коллектива исследователей: «преждевременно заключать, что клетки, созданные подобным образом, могут заменить ЭСК».

По данным Takahashi и др. [723], полученные ими клоны ИПСК человека содержали от 3-х до 6 ретровирусных включений каждого фактора. Таким образом, каждый клон имел в целом более 20 возможных мест включения ретровирусов, что действительно может повысить риск развития опухоли. Однако все 4 ретровируса в ИПСК человека были прочно заглушены, показывая, что эти клетки эффективно перепрограммированы и их самообновление не зависит от постопро-

* Информация представлена на сайте <http://www.gazeta.ru/news/science/2009/04/24/n1355364.shtml>

янной экспрессии трансгенов. В отличие от клеток человека, у 20 % мышей с индуцируемыми полипотентными клетками развивались опухоли, которые можно объяснить, по крайней мере частично, реактивацией ретровируса с-Мус [543].

В некоторых работах [46] высказывается предположение, что опосредованная ретровирусами интеграция в геном трансдуцированных сДНК может вызвать повреждение онкосупрессорных генов. Следовательно, необходимо обеспечить альтернативный метод превращения взрослых соматических клеток в ИПСК без риска мутагенеза. Преходящая трансфекция отобранных сДНК или микроинъекция определенных рекомбинантных белков могут быть применены для обеспечения перепрограммирования соматических ядер. Другой возможностью может быть межвидовой перенос ядер соматических клеток (iSCNT) [Beyhan et al., 2007].

В последнее время стали известны данные, позволяющие предполагать, что индуцировать «стволовитость» можно без встраивания опасных для организма генов. Профессор Sheng Ding и его коллеги из Скриппсовского исследовательского института США показали, что фибробласты мыши могут превращаться в стволовые клетки в результате непосредственного воздействия белковых молекул Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус. Эти белки получали методом генной инженерии из бактерий *E.coli* и подвергали двойной очистке. Для обеспечения более легкого проникновения через плазматическую мембрану клеток к белкам присоединяли фрагменты полиаргининового белкового домена. Согласно протоколу авторов, для полного перепрограммирования клеток необходимо несколько стадий обработки фибробластов раствором очищенных белков, содержащим вальпроовую кислоту. Эта кислота часто используется в медицине как противозлептическое средство широкого спектра действия. Вальпроовая (2-пропилвалериановая) кислота способствует переходу клеток в недифференцированное состояние. Авторы отметили, что полученные ими «белково-индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» подвергались специфической дифференцировке и формировали ткани развивающихся эмбрионов мышей. Дальнейшие работы должны определить, смогут ли ИПСК человека найти свое применение в медицинской практике.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Akashi K., He X., Chen J., et al. Special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb transcriptional accessibility for genes of multiple tissues // *Blood*. — 2003. — Vol. 101. — P. 383–389.

Beyhan Z., Iager A.E., Cibelli J.B. Interspecies nuclear transfer implications for embryonic stem cell biology // *Cell Stem Cell*. — 2007. — Vol. 1, N 5. — P. 502–512.

Boyd A.W., Schrader J.W. Derivation of macrophage-like lines from the pre-B lymphoma ABL81 using 5-azacytidine // *Nature*. — 1982. — Vol. 297. — P. 691–693.

Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L., et al. Producing primate embryonic stem cells in the absence of drug selection // *Nature*. — 2007. — Vol. 450. — P. 497–502.

Cawley S., Bekiranov S., Ng H.H., et al. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs // *Cell*. — 2004. — Vol. 116. — P. 499–509.

Gurdon J.B., Colmon A.V. The future of cloning // *Nature*. — 1999. — Vol. 402. — P. 743–746.

Hansis C., Barreto G., Maltry N., Niehrs C. Nuclear reprogramming of human somatic cells by *Xenopus* egg extract requires BRG1 // *Curr. Biol*. — 2004. — Vol. 14. — P. 1475–1480.

Kikyo N., Wade P.A., Guschin D., et al. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI // *Science*. — 2000. — Vol. 289. — P. 2360–2362.

Knoepfler P.S., Zhang X.Y., Cheng P.F., et al. Myc influences global chromatin structure // *EMBO J*. — 1996. — Vol. 25. — P. 2723–2734.

Knoepfler P.S., Zhang X.Y., Cheng P.F., et al. Myc influences global chromatin structure // *EMBO J*. — 2006. — Vol. 25. — P. 2723–2734.

Kopp J.L., Ormsbee B.D., Desler M., et al. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells // *Stem Cells* — 2008. — Vol. 29. — P. 903–911.

Peukert K., Staller P., Schneider A., et al. An alternative pathway for gene regulation by Myc // EMBO J. — 1997. — Vol. 16. — P. 5672–5686.

Poccia D.L., Collas P. Transforming sperm nuclei into male pronuclei in vivo and in vitro // Curr. Topics Devl. Biol. — 1996. — Vol. 34. — P. 25–88.

Sanford J., Clark H.J., Chapman V., et al. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse // Genes Dev. — 1987. — Vol. 1. — P. 1751–1755.

Shiels P.G., Kind A.J., Campbell K.H., et al. Analysis of telomere lengths in cloned sheep // Nature. — 1999. — Vol. 399. — P. 362–367.

Tanaka T.S., Kunath T., Kimber W.L., et al. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals genes associated with pluripotency and lineage specificity // Genome Res. — 2002. — Vol. 12. — P. 1921–1928.

ЧАСТЬ 2. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ

ГЛАВА 9. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ СПЕРМАТОГЕННОЙ СИСТЕМЫ

Передача генетического материала следующему поколению является основным принципом сохранения вида. При развитии млекопитающих половые клетки специализируются сразу после имплантации эмбриона, выселяясь из эпибласта, состоящего из плюрипотентных стволовых клеток. Специализация индуцируется сигналами ВМР, поступающими из внеэмбриональной эктодермы. После гастрюляции клетки-предшественники выявляются у мышей на 7,5-й день после зачатия в экстраэмбриональной мезодерме, где они дифференцируются в первичные (примордиальные) зародышевые клетки (ПЗК) или гоноциты, ответственные за передачу генетической информации от одного поколения другому. Затем ПЗК мигрируют в направлении будущих гонад. В ходе миграции ПЗК быстро делятся путем митоза, и к моменту заселения зачатков гонад их численность возрастает более чем в 50 раз. Соматические клетки зародыша гонад (прежде всего целомический эпителий) создают специфическое микроокружение для ПЗК. Они выделяют ряд ростовых факторов, которые предотвращают гибель клеток и подавляют их дифференцировку в гаметы [Molyneaux, et al., 2001].

Мужские гонады — классическая система, в которой из небольшой популяции ПЗК формируются, по крайней мере, две субпопуляции СК, отличающиеся по своему предназначению. Одна субпопуляция — стволовые сперматогонияльные клетки (ССГК) — поддерживает образование высокодифференцированных короткоживущих сперматозоидов в течение всей репродуктивной жизни. Из другой субпопуляции ПЗК образуются СК зародышевой линии (СКЗЛ), которые теряют специфичность половых клеток, но сохраняют местонахождение в семенниках и плюрипотентный потенциал ПЗК, способных стать стойкими, клоногенными основателями дифференцирующихся в различных направлениях клеток.

У эмбрионов мужского пола мигрирующие в гонады гоноциты делятся несколько раз, и часть их преобразуется в ССГК. На этом этапе сперматогенез приостанавливается и возобновляется уже при наступлении полового созревания, когда ССГК подвергаются мейозу и происходит их дифференцировка в сперматогонии типа А (темная цитоплазма). Последние медленно делятся с образованием светлых быстроделющихся прогениторных клеток, дающих начало сперматогониям типа В. Последние, в свою очередь, вступают на путь дифференцировки в сперматоциты, а далее в сперматиды и сперматозоиды [Kiger, Fuller, 2004].

Дифференцировка ПЗК и ССГК зависит от межклеточных взаимодействий и экспрессии генов: *steel*, *c-kit*, *VASA*, *DAZL*, *fragilis*, *miwi*, *mili*, *mill* и *mil2* [Lacham-Kaplan, 2004]. Для спецификации ПЗК важное значение также имеет синергичное действие членов суперсемейств ВМР и TGF- β [Kierszenbaum, Tres, 2001]. С развитием ПЗК особенно связан ВМР-4, который образуется в экстраэмбриональной мезодерме, а также в клетках Сертоли. Добавление этого белка к культурам ПЗК содействовало их развитию в дифференцированные зародышевые клетки [Hubner, et al., 2003].

У мышей морфологические отличия женских и мужских гонад проявляются примерно на 12–12,5 день развития [Lacham-Kaplan, 2004]. Хотя несколько генов, которые появляются в это время как в мужских, так и в женских гонадах, имеют отношение к половой дифференцировке, особое внимание было уделено гену *Sry*, локализованному на Y-хромосоме. Каким образом ген *Sry* определяет дифференцировку гонад по мужскому типу, неизвестно. Предполагают, что конечный результат может быть связан с экспрессией этого гена и клеточными взаимодействиями [Lacham-Kaplan, 2004]. После установления пола мужские зародышевые клетки задерживаются в митозе до рождения. Женские зародышевые клетки входят в профазу мейоза. Недавно был идентифицирован ген *Stra8* как ранний молекулярный маркер дифференцировки женских зародышевых клеток [Menke, et al., 2003]. Было выявлено повышение экспрессии гена *Stra8* в зародышевых клетках гонад XX до вхождения в мейоз и отсутствие экспрессии этого гена в мужских ПЗК.

До недавнего времени предполагали, что самки не сохраняют ПЗК для оогенеза и образования фолликулов в течение взрослой жизни, как самцы для поддержания сперматогенеза. Но в последнее время в яичниках ювенильных и взрослых мышей и взрослых женщин были обнаружены митотически активные ПЗК, обеспечивающие длительное пополнение пула фолликулов [Johnson, et al., 2004; Bukovsky, et al., 2004]. Таким образом, можно полагать, что у самцов и самок происходит сходный процесс дифференцировки ПЗК.

В отличие от ССК, СКЗЛ плюрипотентны и могут образовать дифференцированные соматические и половые клетки [Kiger, Fuller, 2004]. В гонадах СКЗЛ идентифицируются по ряду критериев: анатомическому положению внутри ниши, выраженному поведенческому и молекулярному фенотипу, экспрессии щелочной фосфатазы (ЩФ). Мужские ПЗК локализуются в семенниках в определенных регионах, окруженные соматическими клетками. Тесная связь между ПЗК и специфическими типами соматических клеток предполагает роль последних в регуляции физиологии ПЗК. Установлено, что эпителий половых валиков, в которых расположены зачатки гонад, секретирует аттрактантные для ПЗК вещества, определяющие направление миграции всех клеток, находящихся в соединительнотканых межканальцевых прослойках; эти вещества задерживают ПЗК в капиллярах, расположенных вблизи зачатков гонад. Аттрактантная субстанция (хемокин) представляет собой гликопротеин и не обладает видовой специфичностью. Соматические клетки зачатков гонад, большинство которых является клетками Сертоли, выделяют ряд ростовых факторов. Эти факторы подавляют дифференцировку ПЗК в половые клетки (гаметы) и, кроме того, предотвращают их гибель, так как ПЗК, не попавшие в зачатки гонад, подвергаются апоптозу и погибают. Если дифференцировка ПЗК не произошла, эти клетки длительное время пребывают в недифференцированном состоянии, которое завершается мейозом к моменту достижения организмом половой зрелости.

СКЗЛ составляют в гонадах 0,03 % от общего числа зародышевых клеток [Kiger, Fuller, 2004]. В течение раннего эмбрионального периода (> 56 дней) количество ПЗК у обоих полов увеличивается постепенно с разрастанием недифференцированных гонад. Во время позднего эмбрионального периода у ПЗК плодов ХУ происходит задержка митозов в связи с появлением клеток Сертоли и образованием полового корда. В половом гребне женщин содержание ПЗК продолжает возрастать в течение всего раннего фетального периода (> 56 дней) [Turnpenny, et al., 2003].

Предполагают, что для нормального функционирования СКЗЛ необходимы как гены, функционирующие внутри самих клеток, так и гены, экспрессированные в окружающих соматических поддерживающих клетках. На выживание ПЗК влияют ростовые факторы LIF и OSM, пара Steel (Sl) рецептор — лиганд, ген *Dominant white spotting (W)* и др. Наконец, повреждение гена фактора роста BMP8b, который обычно экспрессирован в ранних зародышевых клетках, приводит к снижению числа ПЗК в гонадах плода и вызывает задержку инициации сперматогенеза. Сигналы окружения могут влиять на превращение ПЗК в СК мужской зародышевой линии после заселения эмбриональных гонад. Соматические клетки гонад необходимы для надлежащего развития мужских клеток зародышевой линии, включая экспрессию половых и стадийспецифических генов. Соматические клетки гонад также, кажется, участвуют в развитии специфической для каждого пола программы и определении времени начала гаметогенеза. Появление и долговременное поддержание делений мужских СКЗЛ регулируются, вероятно, независимо. Согласно одной гипотезе, только некоторые ПЗК приобретают и/или сохраняют способность к самообновлению, тогда как другие ПЗК дифференцируются без самообновляющихся делений. Хотя эти механизмы еще не раскрыты, предполагают, что сигналы из соматических гонад определяют, какие клетки первичной однородной популяции ПЗК сохраняются, а какие дифференцируются [Kiger, Fuller, 2004].

В норме судьба ПЗК ограничивается дифференцировкой в клетки половой системы. Однако в некоторых случаях, например в тестисах плодов мышей линии 129Sv, они конвертируются в плюрипотентные СК с последующим образованием тератом, содержащим различные типы дифференцированных клеток [цит. Matsui, 2010]. В условиях культуры ПЗК также развивают-

ся в плюрипотентные эмбриональные зародышевые клетки (ЭЗК). Для получения ЭЗК мыши необходимо наличие нескольких ростовых факторов (SCF, LIF, FGF) и фидерного слоя из митотически инактивированных фибробластов. В культуре ЭЗК морфологически неотличимы от ЭСК и экспрессируют такие типичные маркеры, как SSEA-1 и Oct4. При введении в бластоцисты они содействуют получению химерных мышей, содержащих в своих тканях зародышевые клетки. [Labosky, et al., 1994; Stewart, et al., 1994].

О получении ЭЗК человека впервые было сообщено в 1998 году [675], одновременно с получением ЭСК человека. Авторы этих работ [674, 675] при изучении *in vitro* клеток гонад плодов человека 5–11 недель гестации обнаружили их быструю пролиферацию с появлением многочисленных колоний. 1–5 % этих колоний образовывали эмбрионидные тельца (ЭТ). При иммуногистохимическом анализе срезов ЭТ была выявлена положительная реакция на антитела к нестину, виментину, нейронспецифической энolahе и некоторым другим маркерным белкам нейронов и глии (эктодерма). Клетки также демонстрировали положительную реакцию на антитела к кератину VII, α -1-фетопротейну и GATA4 (эндодерма), десмину и актину мышц (мезодерма). Одновременная экспрессия маркеров нескольких различных линий была подтверждена анализом генов.

Turnpenny и др. [Turnpenny, et al., 2003] получали ЭЗК из плодов человека обоих полов 7–9 недель. После культивирования клеток в течение 3-х недель образующиеся ЭТ собирали и исследовали на иммунореактивность с рядом специфических моноклональных и поликлональных антител. Авторы установили исчезновение и/или снижение экспрессии ряда маркеров плюрипотентных и недифференцированных клеток с одновременным появлением маркеров, специфических для всех зародышевых листков. Была обнаружена экспрессия ряда генов, считающихся маркерами эктодермальной (белок нейроволокон, NF200), мезодермальной (актин мышц) и эндодермальной (амилаза) линий.

Авторы работы [459] при культивировании зародышевых клеток плодов человека 6–8 недель гестации также выявили экспрессию маркеров, указывающих на возможность дифференцировки ЭЗК в ткани всех трех зародышевых листков: эндодермы (общий кератин, кератин VII, α -1-фетопротейн), мезодермы (десмин, актин мышц) и эктодермы (белок S-100). Wang и др. [Wang, et al., 2005] выделяли плюрипотентные СК из гонад клонированных эмбрионов телят. После культивирования недифференцированных ЭЗК в течение более года эти клетки сохраняли способность развиваться в ЭТ и экспрессировать одновременно производные всех трех зародышевых листков, а именно кератин (эндодерма), актин α_2 гладкой мышцы аорты (мезодерма) и тубулин β_3 (эктодерма).

В отличие от ЭСК, ЭЗК сохраняют некоторые свойства первичных примордиальных зародышевых клеток, включая паттерны деметилированного генома, следы геномных импринтов и реактивации X-хромосом [Labosky et al., 1994; 719]. Степень выраженности этих свойств отражает, вероятно, стадию развития примордиальных клеток, из которых ЭЗК были получены [Shovlin, et al., 2008].

СКЗЛ со свойствами близкими ЭСК были не так давно выделены из семенников новорожденных и взрослых мышей [284, 370]. Эти клетки имели такую же морфологию, как ЭСК, экспрессировали маркеры, специфические для ЭСК, образовывали тератомы и дифференцировались в многочисленные линии *in vitro*. Однако эпигенетический статус этих СКЗЛ отличался от статуса как ЭСК, так и клеток зародышевой линии [370]. Предполагают, что семенники мышей содержат различные субпопуляции СК зародышевой линии [Izadyar, et al., 2008]. Происхождение мультипотентных СКЗЛ еще не полностью раскрыто. Возможно, что в культуре СКЗЛ *in vitro* репрограммируется небольшое число этих клеток для постоянного наличия клеток, подобных ЭСК [833].

Вышесказанное можно проиллюстрировать результатами работы [Seande, et al., 2007], авторы которой предположили, что поверхностный белок GPR125, экспрессирующийся в семенниках неонатальных мышей, является не только потенциальным маркером ССГК, но и маркером субпопуляции сперматогенных клеток, конвертирующихся в ЭСК-подобные клетки при

длительном культивировании. На первом этапе исследования, для визуализации экспрессии GPR125 генноинженерными методами были получены мыши, несущие ген LacZ, под контролем GPR125-промотора. Окрашивание срезов тестикул на наличие галактозидазы, показало, что экспрессия маркера обнаруживалась лишь в извитых семенных канальцах и ограничивалась первым слоем клеток, непосредственно прилегающих к базальной мембране, то есть являвшихся сперматогониями. Культивирование сперматогенных клеток от GPR125lacZ/lacZ мышей на фидере из инактивированных тестикулярных стромальных клеток, содержащих CD34⁺ перитубулярные клетки, которые играют ключевую роль в экспансии сперматогенных клеток, приводило к получению пролиферирующих колоний с экспоненциальной фазой роста. Клетки многократно пассировались и поддерживались в культуре вплоть до 1 года без каких-либо признаков трансформации. На протяжении всего времени культивирования клетки поддерживали постоянный уровень экспрессии GPR125 и не экспрессировали поверхностный маркер c-kit. Эти GPR125⁺(c-kit⁻)-позитивные клетки экспрессировали герминальные транскрипционные факторы Dazl, PLZF, Mvh и не экспрессировали транскрипционные факторы, характерные для более поздних стадий дифференцировки ССГК (Sox17, Tnp1, Adam2, Prm1 и Pgc2). Эти данные свидетельствуют, что репопулирующие СКЗЛ имели герминальное происхождение и при этом находились в недифференцированном состоянии.

После трех месяцев культивирования GPR125⁺(c-kit⁻)-позитивных клеток наряду с типичными колониями наблюдалось появление ЭСК-подобных колоний клеток, обозначенных авторами как MACS (multipotent adult spermatogonial-derived stem cells). MACS имели более высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение и успешно пролиферировали в среде для культивирования мышиных ЭСК. Абсолютное большинство MACS после длительного культивирования имели нормальный кариотип без каких-либо цитогенетических аномалий и экспрессировали высокие уровни GPR125 и OCT4. На первом этапе дифференцировочный потенциал MASC оценивался путем формирования и дифференцировки эмбрионных тельц *in vitro*. В течение 7 дней после посева в формирующихся эмбрионных тельцах выявлялись разные уровни экспрессии GPR125 с четкими границами между GPR125⁺ и GPR125⁻ областями. Полностью сформированные колонии содержали HNF3b⁺ (FOXA2⁺) клетки, являющиеся производными эндо- или эктодермы, цитокератин-позитивные или GFAP⁺ клетки, являющиеся производными эктодермы, и клетки, экспрессирующие миозин скелетных мышц и являющиеся производными мезодермы. Подкожная трансплантация MASC иммунодефицитным мышам приводила к формированию тератом, содержащих производные всех трех зародышевых листков. Введение в полость бластоцист приводило к формированию химерных эмбрионов с эффективностью 22 % (8 эмбрионов из 37 бластоцист).

Анализ экспрессии транскрипционных факторов MASC в сравнении с ЭСК и ССГК показал высокий уровень экспрессии Oct4, Nanog и Sox2 в MASC и ЭСК [Seandel, et al., 2007]. Минимальная экспрессия типичных маркеров сперматогонияльных стволовых клеток, Plzf, Ret и Stra8, наблюдалась у MASC, тогда как высокая степень экспрессии этих факторов, как и ожидалось, обнаруживалась у ССГК. Удивительно, что некоторые герминально-ассоциированные факторы транскрипции (например, Dazl) практически не экспрессировались в MASC, так же, как и некоторые типичные факторы транскрипции ЭСК (Gdf3, Esg1, Rex1). Различия в экспрессии этих генов свидетельствует, что MASC являются отдельным типом стволовых клеток.

Репрограммирование сперматогонияльных СК не может быть осуществлено на самках. В качестве альтернативы гистосовместимые ЭСК можно получить партеногенезом. Так как для развития эмбрионов млекопитающих необходима экспрессия обоих родительских генов, партеногенетические эмбрионы погибают на ранней стадии развития сразу после имплантации. Однако у мышей и приматов были получены партеногенетические ЭСК и у этих клеток, существующих уже как физиологическая реальность, обнаружили наличие плюрипотентности [155]. В период преимплантационного развития клонированных эмбрионов в разных частях генома выявляли изменения метилирования ДНК, что также является доказательством неполного эпигенетиче-

ского репрограммирования донорской ДНК [228]. Новые перспективы эпигенетической дифференцировки обеспечило открытие, что у мышей перенос ядра в зиготы с задержкой митоза в клетках реципиента может повысить эффективность спонтанного репрограммирования.

Таким образом, в работах последнего времени установлена возможность получения из ПЗК нескольких популяций высокопотентных СК, способных к дифференцировке в клетки тканей всех трех зародышевых листков. При этом отмечено сохранение нормального кариотипа XX или XY и активности теломеразы. Так, у ЭЗК выявляется высокая активность ИЦФ, экспрессия фактора транскрипции Oct4 и антигенов TRA-1-60, TRA-1-81, EMA-1 и SSEA-1, но не SSEA-3 [459]. Эти исследования дают основание предполагать, что стволовые клетки половой системы человека в будущем могут быть использованы в клинической практике для восстановления поврежденных органов и тканей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Anderson A., Copel T.K., Scholer H., et al. The onset of germ cell migration in the mouse embryo // Mechanism of Development. — 2000. — Vol. 91. — P. 61–68.

Bukovsky A., Caudle M.R., Svetlikova M., et al. Formation of new primary follicles in adult human ovaries // Reprod. Biol. Endocrinol. — 2004. — Vol. 2. — P. 20–32.

De Roij D.G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells // Reproduction. — 2001. — Vol. 121. — P. 347–354.

De Roij D.G., Grootegoed J.A. Spermatogonial stem cells // Curr. Opin. Cell Biol. — 1998. — Vol. 10. — P. 694–701.

Geijsen N., Horoschak M., Kim K., et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells // Nature. — 2004. — Vol. 427. — P. 148–154.

Hubner K., Fuhrmann G., Christenson L.K., et al. Derivation of oocytes from embryonic stem cells // Science. — 2003. — Vol. 300. — P. 1251–1256.

Izadyar F., Pau F., Marh J., et al. Generation of multipotent cell lines from a distinct populations of male germ line stem cells // Reproduction. — 2008. — Vol. 135. — P. 771–784.

Johnson J., Canning J., Tomoko Kaneko T., et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary // Nature. — 2004. — Vol. 428. — P. 145–150.

Kierszenbaum A., Tres L.L. Primordial germ cell–somatic cell partnership: a balancing cell signalling act // Mol. Reprod. and Development. — 2001. — Vol. 60. — P. 277–280.

Lacham-Kaplan J. In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse // Reproduction. — 2004. — Vol. 128. — P. 147–152.

Labosky P.A., Barlow D.P., Hogan B.L. Mouse embryonic germ cell lines: Transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem cell lines // Development. — 1994. — Vol. 120. — P. 3197–3204.

Matsui Y. The molecular mechanisms regulating germ cell development and potential // J. Androl. — 2010. — Vol. 31, 1. — P. 61–65.

Meng X., Lindahl M., Hyvonen M.E., et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF // Science. — 2000. — Vol. 287. — P. 1489–1493.

Menke D.B., Koubova J., Page D.C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to posterior wave // Dev. Biol. — 2003. — Vol. 262. — P. 303–312.

Molyneaux K.A., Stallock J., Schaible K., et al. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration // Dev. Biol. — 2001. — Vol. 240. — P. 488–498.

Seande M., James D., Shmelkov S., et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR1251 germline progenitors // Nature. — 2007. — Vol. 449. — P. 346–352.

Shovlin T.C., Durcova-Hills G., Surani A., et al. Heterogeneity in imprinted methylation patterns of pluripotent embryonic germ cells derived from pre-migratory mouse germ cells // Dev. Biol. — 2008. — Vol. 313. — P. 674–681.

Stewart C.L., Gali I., Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line // Dev. Biol. — 1994. — Vol. 161. — P. 626–628.

Toyooka Y., Tsunekawa N., Akasu R., et al. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 11457–11462.

Turnpenny L., Brickwood S., Spalluto C.M. Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells // Stem Cells. — 2003. — Vol. 21. — P. 598–609.

Wang L., Duan E., Sung L., et al. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos // Biol. Reproduction. — 2005. — Vol. 73. — P. 149–155.

ГЛАВА 10. СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

10.1. Роль стволовых клеток в развитии центральной нервной системы

Нервная система зародыша человека возникает из трех образований эктодермы (рис. 10.1):

- 1) нервной пластинки, развивающейся из уплотнения первичной эктодермы. Из нее в несколько стадий происходит процесс закладки и формирования нервной трубки — будущих головного и спинного мозга;
- 2) клеток нервного гребня, возникающих из полосы на границе между нервной пластинкой и остальной эктодермой (будущая автономная периферическая нервная система, ПНС);
- 3) эктодермальной плакоды (сенсорные ганглии черепно-мозговых нервов, гипофиз, нейроэпителий внутреннего уха и глаза) [25].

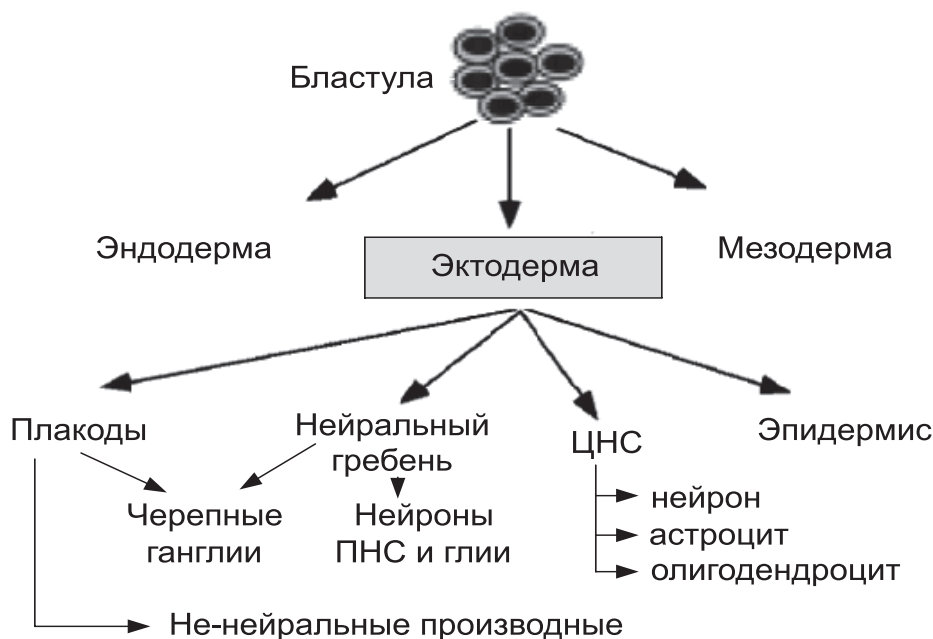


Рис. 10.1. Нейральная дифференцировка во время развития

ЭСК подвергаются дифференцировке *in vitro* и *in vivo* с образованием эктодермальных, эндодермальных и мезодермальных производных. Позже эктодерма подвергается дифференцировке с образованием центральной (ЦНС) и периферической (ПНС) нервной системы. Клетки-предшественники возникают из 3-х различных доменов и образуют отдельные, но перекрывающиеся производные (по Paniker & Rao, 2004).

Нейральные стволовые клетки (НСК) могут быть выделены из многих регионов ЦНС плода, что позволяет даже говорить об убиквитарности (повсеместности) этих клеток [729]. Главные пулы СК нервной трубки сконцентрированы в эпендиме и субэпендиме, в перивентрикулярной области мозга, в эпендиме сосудистых сплетений, в «реликтах» нейроэпителия, сохраняющихся в спинном мозгу [25]. У плода крысы на 8-е сутки развития (E8) около 50 % клеток спинной нервной трубки являются НСК [Kalyani, et al., 1997, 1998]. У мыши на 10-е сутки развития (E10) в нейроэпителии телэнцефалического пузыря содержится от 5 до 20 % НСК [He, et al., 2001; Qian, et al., 2000].

Большинство клеток нервного гребня в предмиграционный период также состоит из СК [White, et al., 2001]. Однако в ходе развития плода процентное содержание СК быстро падает в связи с тем, что они «разводятся» прогениторными и дифференцированными клетками. Напри-

мер, в спинном мозге эмбриона E12 содержание СК составляет уже 10 %, а к началу постнатального периода — только 1 % от общего числа клеток спинного мозга [Kalyani, et al., 1997; 1998]. Раннее и высокое содержание СК в эмбриональной ЦНС предполагает их ключевую роль в ее развитии. Была установлена возможность самообновления в коре мозга мультипотентных СК, выделенных из эмбрионов крыс, при использовании FGF-2 и среды, кондиционированной глией [Davis & Temple, 1994]. Другие авторы [634] показали, что выживание и пролиферация мультипотентных СК из полосатого тела эмбриона мыши зависит от наличия EGF. Долговременные культуры прогениторных клеток были получены из гиппокампа, спинного и переднего мозга эмбриона крысы [Baggy, et al., 2001] и коры мозга эмбриона мыши [Kilpatrick, Bartlett, 1995]. Работы на клонированных клетках подтвердили, что большая часть клеток глии, как астроцитов, так и олигодендроцитов, происходит из НСК эмбриона [Rao, 1999; Qian, et al., 2000; He, et al., 2001]. Таким образом, НСК, проявляющие *in vitro* пролиферативную мультипотентную природу, являются основными предшественниками нервной системы *in vivo*.

10.2. Нейрогенез в ЦНС взрослых млекопитающих

В мозгу взрослых имеются 2 зоны, в которых образование нейронов продолжается на протяжении всей взрослой жизни: субгранулярная зона (SGZ) зубчатой извилины (gyrus dentatus) гиппокампа и субвентрикулярная (субэпендимарная) зона (SVZ) боковых желудочков (рис. 10.2). Структурно-функциональной единицей нейрогенной системы зрелого мозга млекопитающих является микроассоциация, состоящая из 4-х типов клеток: 1) нейробластов или клеток типа А,

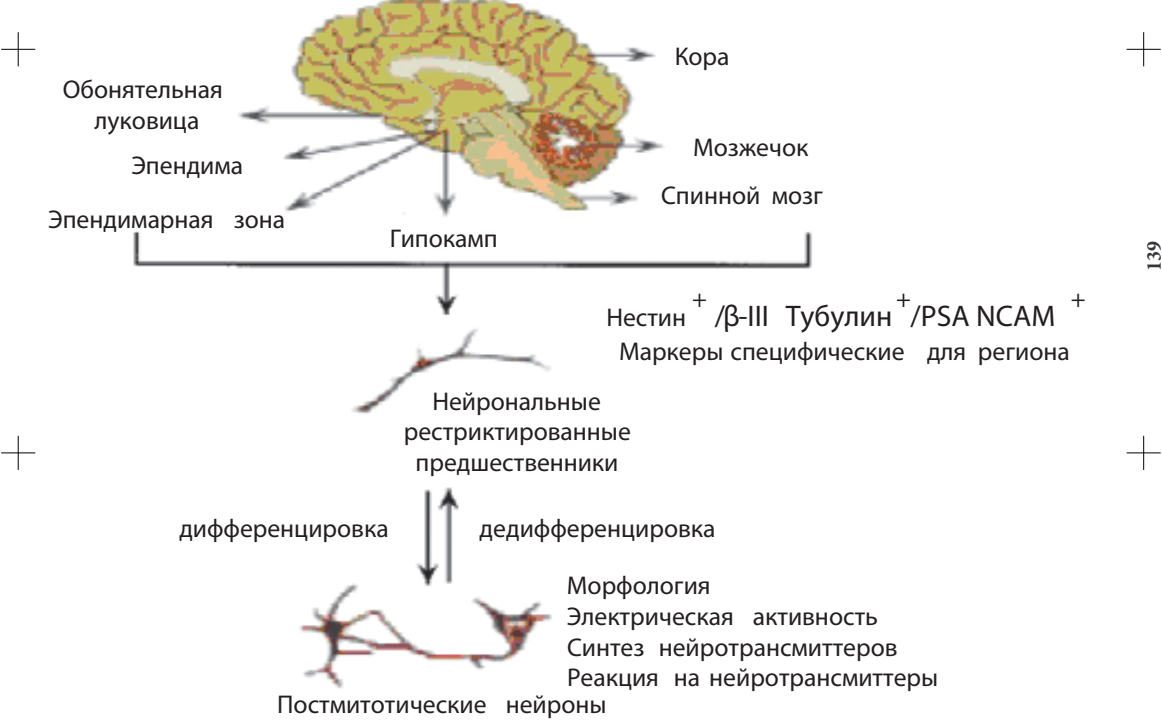


Рис. 10.2. Нейронально-рестриктивные предшественники

Клетки, образующие главным образом нейроны, выделяются из многих регионов головного мозга. Эти клетки обладают некоторыми общими характеристиками, но, вероятно, отличаются по экспрессии регион-специфических маркеров и способности дифференцироваться в специфические подклассы нейронов. Дифференцированные нейроны классифицируются на основании морфологии, профиля нейротрансмиттеров, реакции на нейротрансмиттеры и электрофизиологической реакции на возбуждающий и подавляющий стимул (по Paniker & Rao, 2004).

проявляющих уже некоторые нейральные признаки, в частности, экспрессию ВМ-тубулина; 2) клеток типа В, имеющих ультраструктурные и молекулярные признаки астроцитов; 3) клеток типа С, являющихся транзиторными амплифицирующимися клетками; 4) эпендимарных или клеток Е типа, выстилающих внутреннюю поверхность желудочков. Клетки типа А мигрируют цепочками через туннели, образованные отростками клеток В типа, в ростральный миграционный поток и попадают далее в обонятельную луковицу, в которой высокая концентрация BMP4 способствует выходу незрелых нейральных клеток из клеточного цикла и запускает их дальнейшую дифференцировку (рис. 10.3) [обзоры 37; 87]. Опыты с применением маркера пролиферации бромдезоксисуридина (BrdU) помогли установить, что сотни клеток внутри тонкого слоя SGZ мозга взрослых животных делятся ежедневно. Около половины новообразованных клеток становятся гранулированными нейронами; до 15 % дифференцируются в клетки глии; тогда как остальные клетки не показывают выраженного нейрогенного или глиального фенотипа в течение длительного (до 4-х недель) наблюдения [257].

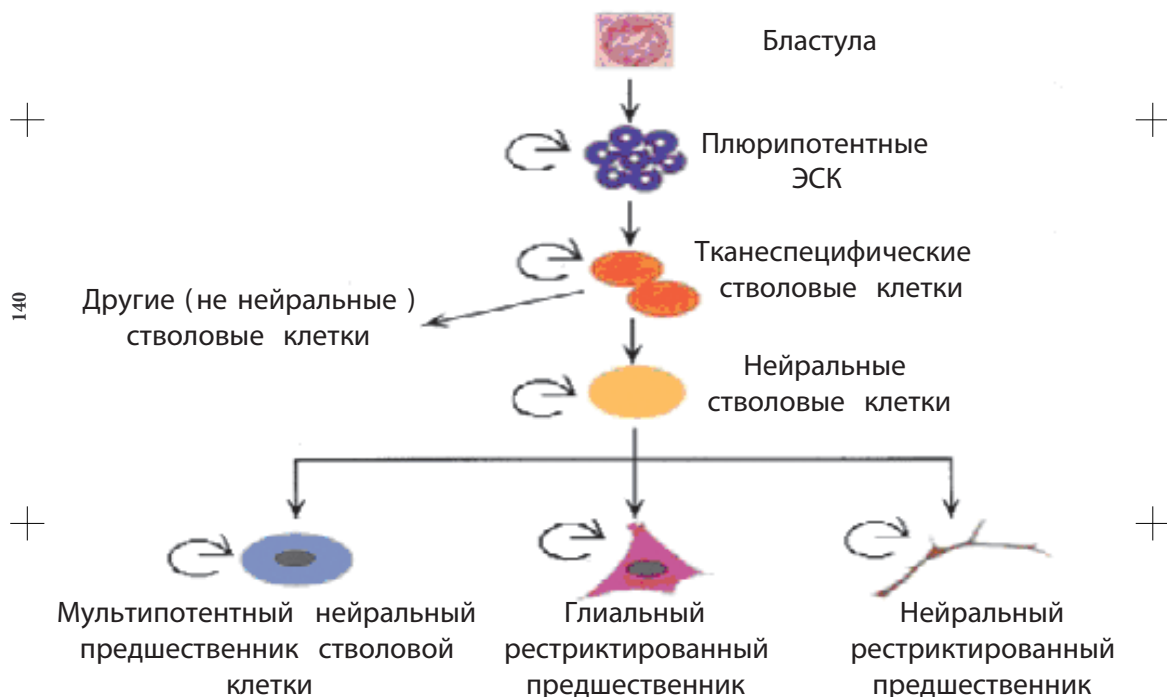


Рис. 10.3. Нейральные предшественники, образующиеся из ЭСК в культуре *in vitro*

ЭСК мыши дифференцируются в культуре с появлением нескольких классов нейральных стволовых клеток. В числе их мультипотентные СК, нейральные и глиальные рестриктированные клетки-предшественники. Методы дифференцировки нейральных и глиальных предшественников очень схожи и основываются на протоколах, разработанных Bain, et al. [71]. По Paniker & Rao, 2004.

Во второй половине 60-х годов прошлого столетия было установлено непрерывное образование новых нейронов в гиппокампе зрелых крыс [Altman, Das, 1965]. Применив тот же метод мечения делящихся клеток для изучения мозга человека, другие авторы неопровержимо доказали, что новые нейроны образуются не только в гиппокампе взрослого человека, а также в SVZ [Eriksson, et al., 1998]. В SVZ нейроны появляются в 2 раза чаще, чем клетки глии, с образованием в течение суток одного нового нейрона на каждые 2000 клеток [25]. У взрослых крыс в зубчатой извилине гиппокампа на протяжении одного дня образуется до 9 тыс. новых нейронов, а на протяжении 1 месяца количество новообразованных нейронов составляет 25 тыс. [обзор 37]. С применением BrdU были установлены главные потоки миграции клеток

в обонятельную луковицу, гиппокамп, зубчатую извилину [25]. В случае повреждения головного или спинного мозга число меченных BrdU клеток в SVZ резко возрастало. Но когда быстро пролиферирующие клетки SVZ были селективно элиминированы, истощения пула НСК не выявили. В связи с этим заключили, что основным источником СК ЦНС взрослых являются ресниччатые клетки эпендимы боковых желудочков [Johansson, et al., 1999a]. По мнению многих исследователей, эти клетки относятся к типу В и проявляют некоторые фенотипические свойства астроцитов, в частности, экспрессию GFAP [обзоры 37; 87]. Было показано, что меченые клетки эпендимы, экспрессирующие нестин и рецепторы Notch, дифференцируются *in vivo* в нейроны обонятельной луковицы, а *in vitro* образуют нейросферы, проявляющие трехлинейный потенциал дифференцировки (нейроны — β III-тубулин; астроциты — GFAP; олигодендроциты — O4) [Johansson, et al., 1999a]. Способность нейросфер после разъединения образовывать новые вторичные нейросферы принимается как доказательство мультипотентности исходной клетки. Применяв подход, который был разработан для выделения и размножения прогениторных клеток из мозга плодов грызунов, с использованием FGF-2 были выделены мультипотентные СК из гиппокампа взрослых животных [Barry, et al., 2001; Palmer, et al., 1997]. Эти клетки сохранялись в течение многих пассажей и легко рекультивировались после криоконсервирования. В культуре клетки росли в виде монослоя, прикрепляясь к субстрату (полиорнитин или ламинин), но без образования нейросфер. Генетическим маркированием отдельных клеток и потомства клонов, полученных из единичных клеток, подтвердили наличие у многих этих клеток свойств СК: появление способности к самообновлению и потенциала к образованию нейральных линий [Shihabuddin, et al., 1999].

Дальнейшие исследования, проведенные на взрослых млекопитающих, показали, что после экспозиции со специфическими факторами роста мультипотентные СК, способные к образованию глиальных клеток и нейронов, могут быть выделены из различных регионов ЦНС: обеих нейрогенных зон грызунов [Palmer, et al., 1997], коры мозга человека [Arsenijevic, et al., 2001; Schwartz, et al., 2003], паренхимы спинного мозга крысы [Shihabuddin, et al., 1997; Takahashi, et al., 2003], полосатого тела грызунов [Palmer, et al., 1997], обонятельного эпителия человека [Zhang, et al., 2004]. Изучение прогениторных клеток из регионов мозга, находившихся в покое, позволило заключить, что нейрогенез в мозгу взрослых млекопитающих лимитируется не отсутствием клеток-предшественников, а скорее недостатком факторов, которые регулируют дифференцировку, и/или отсутствием возможности миграции клеток в паренхиме мозга [Shihabuddin, et al., 1999]. В спинном мозге большое значение для развития СК имеет взаимодействие факторов EGF и FGF-2. В регуляции пролиферативной активности и дифференцировки нейрогенных клеток принимают участие также такие факторы, как BMP, BDNF (мозговой нейротрофический фактор), нейропептид Y, полипептид PACAP38 (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) и др. [37].

В обонятельной луковице взрослого человека стволовые клетки типа В с самообновляющейся способностью, имеющие ультраструктурные и молекулярные признаки астроцитов, образуют быстро пролиферирующие транзиторно-амплифицирующиеся клетки (тип С), а те, в свою очередь, образуют прогениторные клетки с рестриктированной (ограниченной) судьбой: нейробласты (клетки А типа), а также глиобласты, которые в конце концов образуют нейроны, олигодендроциты и, возможно, астроциты. Установлено влияние экспрессии ключевых детерминант на судьбу клеток. Например, Pax6 необходим для специализации нейрональной судьбы на стадии нейробласта, хотя на более поздних постмитотических стадиях Pax6 обеспечивает дофаминергическую судьбу клетки. Пронейральный ген Mash 1 экспрессирован у клеток типа С и некоторых нейробластов и имеет значение в специализации как нейрональных, так и олигодендроглиальных линий. Экспрессию Olig2 наблюдали во всех клетках С типа и отметили его влияние на их специализацию и жизнеспособность. Снижение экспрессии Olig2 необходимо для дальнейшего развития нейрональных линий, тогда как поддержание его уровня неизменным обеспечивает у всех последующих потомков судьбу олигодендроглии.

СК, выделенные из различных регионов нервной системы в той или иной стадии развития, производят соответствующее этому региону потомство. СК спинного мозга образуют популяции спинного мозга [Kalyani, et al., 1998]. СК базального переднего мозга, культивированные при клональной плотности, образуют значительно больше ГАМК-ергических нейронов, чем дорсальные СК, культивированные в тех же условиях [He, et al., 2001]. СК нервного гребня (периферическая нервная система), которые локализируются на латеральных краях нервной пластинки, экспрессируют гены и производят потомство, отличающееся от потомства СК ЦНС [Anderson, et al., 1997; Mujtaba, et al., 1998]. Моделирование оси тела осуществляется сигнальными системами, которые передают позиционную информацию. Например, градиенты сигнальных молекул могут определять региональную специфичность популяции прогениторных клеток при условии, что реакция клеток на различные концентрации сигнала отличается [Wolpert, 1994]. В нервной системе характерные формы передне-задней и дорзально-вентральной осей формируются рано, сопутствуя нервной индукции [Altman, Brivanlou, 2001]. Таким образом, СК нервной системы позвоночных являются, по всей вероятности, позиционно специфическими [729].

Потенциал дифференцировки СК нервной системы зависит от стадии развития организма. Наиболее ранние в онтогенетическом отношении клетки нервной трубки могут производить СК как ЦНС, так и периферической нервной системы, предполагая наличие общего предшественника, но затем каждая из этих линий начинает развиваться самостоятельно. У мыши, например, после E13, 5 прогениторные клетки среднего и заднего мозга уже неспособны к образованию телэнцефалических фенотипов [Olsson et al., 1997]. В постнатальном организме СК ЦНС подвергаются асимметричным делениям, образуя вначале нейроны, а затем глию [Qian, et al., 2000]. СК нервного гребня (периферическая нервная система) на более поздних стадиях производят меньше нейронов, которые, к тому же, имеют ограниченный потенциал. Ранние трансплантаты нервного гребня, обогащенные СК, содержат клетки-предшественники, которые могут производить сенсорные нейроны дорсальных корешков ганглия и адренергические, и холинергические автономные нейроны. Но на более поздних стадиях развития нервной системы СК нервного гребня уже не производят нейроны ганглия, а образуют только редкие адренергические симпатические нейроны и холинергические автономные нейроны [White, et al., 2001]. Фенотип СК также изменяется по мере развития зародышевых зон. Эти изменения обусловлены, вероятно, изменением реактивности их факторов роста. Такие сигнальные молекулы, как FGF, морфогенетические белки кости (BMP) и ноггин, могут влиять на индукцию нервных СК на протяжении всей взрослой жизни, но реакции на эти факторы изменяются при переходе в каждый новый период развития.

Механизмы, лежащие в основе временных стадийспецифических изменений СК нервной системы, еще не раскрыты. Линии СК ЦНС мыши проявляют удивительное сходство с аналогичными линиями беспозвоночных [Shen, et al., 1998]. У дрозофилы нейробласты ЦНС экспрессируют последовательно факторы транскрипции Hunchback, Kriippel, гены 1 и 2 POU-доменов, которые определяют образование различных нейронов в тот или иной период развития. Последовательность экспрессии этих факторов может находиться под влиянием внутренних клеточных часов [Isshiki, et al., 2001]. Возможно, что подобные временные механизмы, наряду с окружающей средой, определяют временную спецификацию НСК млекопитающих [729]. Концентрации ростовых факторов изменяются во время развития, и НСК реагируют различно на разные концентрации одних и тех же молекул. Предполагают, что временная информация, также как позиционная информация, может быть передана временными градиентами сигнальных молекул.

10.3. Пролиферация и дифференцировка нейральных стволовых клеток

В регуляции пролиферации и дифференцировки НСК участвует много механизмов. Влиять на судьбу СК или индуцировать ее к дифференцировке в нейроны или глию могут такие специфические сигнальные молекулы, как ретиноевая кислота, FGF-2, EGF, нейтрофильный мозговой фактор, нейтрофильный фактор-3, а также другие ростовые факторы и гормоны [480;

Cameron, et al., 1998]. Дифференцировке СК ЦНС в олигодендроциты *in vitro* способствует тиреоидный гормон. Цилиарный нейтрофильный фактор (CNTF) и BMP содействуют дифференцировке в астроциты, а нейтрофильный фактор тромбоцитов — в нейроны [Shihabuddin, et al., 1997; Shihabuddin, et al., 1999]. EGF и FGF-2 поддерживают недифференцированное состояние НСК [Azizi, et al., 1998]. Инсулин, нейротрофический мозговой фактор и инсулиноподобный фактор роста 1 могут регулировать как пролиферативный потенциал НСК, так и их судьбу [Shihabuddin, et al., 1999]. Более того, НСК реагируют на присутствие в культуральной среде факторов ангиогенеза и гемопоэза — VEGF, PDGF, TGF β и эритропоэтина [Panchision, 2006]. Это свидетельствует о возможности не только прохождения НСК через гематоэнцефалический барьер, но и об их участии в ангиогенезе [37]. Роль генетических факторов в специализации НСК менее ясна, но в регуляции регионспецифической идентичности НСК участвуют, вероятно, многие факторы транскрипции [Frisen, et al., 1998].

В культуре НСК ведут себя как самообновляющиеся в клонах мультипотентные клетки с определенным набором фенотипических признаков [25]. Под влиянием митогенов, таких как EGF и FGF, они образуют характерные скопления плотно уложенных клеток, называемые нейросферами. Все клетки в каждой нейросфере клонально происходят из одной клетки [634]. При помещении на адгезивный субстрат (полиорнитин), удалении из культуральной среды митогенов или добавлении в среду ФТС недифференцированные клетки нейросферы быстро дифференцируются, образуя нейроны, астроциты и олигодендроциты. Это подтверждает мультипотентность первичных клеток клонов [634; Price, Williams, 2001; Saltiel, 2001]. Потенциал к дифференцировке НСК *in vivo* в случае их пересадки животным всегда выше, чем *in vitro*. Сигналы микроокружения в ткани играют решающую роль в судьбе трансплантированных клеток [25]. *In vitro* даже после осторожного разъединения нейросферы часть ее клеток погибает, но выжившие спустя 2 недели образуют новые скопления недифференцированных клеток, отвечающих всем критериям СК [Johansson, et al., 1999; Morrison, et al., 1997]. Мультипотентные нейросферообразующие клетки человека имеют более низкую самообновляющуюся способность, чем клетки грызунов. Качественных и количественных различий у нейросфер, образующихся из мозга лиц разного возраста, не выявляли [Kukekov, et al., 1999]. Даже из мозга старого человека можно выделить нейросферы, мультипотентные клетки которых способны образовать как нейроны, так и глию (астроциты и олигодендроциты).

Фенотип НСК до настоящего времени не полностью охарактеризован. Экспрессия глиально-го фибриллярного кислого белка (GFAP) не может быть использована для идентификации НСК, т.к. в структурах мозга взрослого человека обнаруживается много GFAP-позитивных астроцитов, не обладающих свойствами СК. Экспрессия нестина выявляется у всех видов нейральных клеток-предшественников, включая клетки типа А, В и С, что также исключает возможность специфического выделения НСК, применяя антитела к нестину. Предполагают, что НСК отличаются повышенной экспрессией на поверхности SSEA-1 (стадиеспецифического эмбрионального антигена-1) и внутриклеточного белка Musashi1, являющегося нейральным РНК-связывающим белком. Этот белок репрессирует трансляцию ингибитора Notch m-Numb. Активация сигнала Notch ведет к трансактивации гена HES1, позволяя таким образом сохранить пролиферативное состояние клеток, экспрессирующих Musashi1 [49].

Описан ряд методов, позволяющих получить суспензию, обогащенную клетками, образующими вторичные нейросферы. К таким методам относятся: выделение клеток боковой популяции (SP) с низким уровнем флуоресценции вследствие высокого исключения краской Hoechst, связывающейся с ДНК; использование повышенной экспрессии углевода SSEA-1 на поверхности клеток или низкого уровня белков, связывающих агглютинин арахиса, и др. Установлено, что клетки радиальной глии во время развития действует так же, как нейрональные предшественники. Это наблюдение и выявление GFAP-позитивных астроцитов в регионах SEZ и SGZ мозга взрослого человека привели [Heins, et al., 2002] к предположению, что астроциты не являются конечными дифференцированными клетками, а представляют собой высокопластичные клетки,

способные принять судьбу различных клеток под влиянием наружных и внутренних факторов. В связи с этим представляет интерес вопрос, почему нейрогенез у взрослых осуществляется только в некоторых регионах.

10.4. Ниша нейральных стволовых клеток

Кроме клеток А, В, С и Е типов, о которых говорилось выше, а также предполагаемых СК и их потомков с ограниченным потенциалом дифференцировки еще несколько клеточных типов играют важную роль в создании местного микроокружения, необходимого для сохранения SEZ и SGZ [Doetsch, 2003; Alvarez-Buylla, Lim, 2004]. Doetsch обратил внимание на тесный контакт нейральных предшественников внутри этих зон с астроцитами и кровеносными сосудами, а в SEZ — также на контакт с эпендимой. Обнаружено, что некоторые клетки В типа сохраняют физическую связь с жидкостью желудочков мозга и часто простирают свой единственный отросток в центральную пару микроканалцев. Это предполагает, что вещества, находящиеся в спинномозговой жидкости, т. е. молекулы, секретируемые сосудистым сплетением, участвуют в регуляции нейрогенеза у взрослых.

Важным элементом ниши являются астроциты. Делящиеся клетки-предшественники в SEZ и SGZ сохраняют тесный контакт с астроцитами, которые, вероятно, оказывают некоторое нейрогенное влияние на прогениторные клетки, выполняя функцию «наставников» [87]. Обладает ли астроцит-«наставник» потенциальным СК или является его потомком, ничего определенного сказать пока нельзя, но подобная же двойственная природа типична для радиальной глии во время эмбрионального развития коры мозга [Campbell, Gotz, 2000]. Отмечены также тесные взаимоотношения нейральных предшественников с капиллярами. В SGZ зубчатой извилины обнаружены эндотелиальные клетки, которые не только являются пассивной платформой для делящихся нейральных предшественников, но также активно включаются в клеточное деление, подтверждая, что ангиогенез *in situ* и сосудистое ремоделирование сопутствуют нейрогенезу. В культуре добавление эндотелиальных клеток к нейральным прогениторам вызывает пролиферацию последних, которые остаются при этом в недифференцированном состоянии. После удаления эндотелиальных клеток прогениторы начинают дифференцироваться. При этом они производят больше нейронов, чем прогениторы, растущие без эндотелиальных клеток. Таким образом, предполагается, что эндотелий сосудов активно вовлекается в обеспечение нейрогенных сигналов.

В регуляции поведения в нише НСК участвует несколько факторов, главные из которых следующие:

1) рецепторы сигналов EGF и FGF2. Инъекция внутрь желудочков мозга лигандов рецепторов EGF вызывала массивную пролиферацию клеток SEZ, но не повышала нейрогенез в обонятельной луковице [Campbell, Gotz, 2002]. При этом следует иметь в виду, что *in vivo* рецептор EGF может возбуждаться не самим EGF, а его альтернативным лигандом TGF- α . Экзогенный EGF действует, главным образом, на клетки типа С, экспрессирующие большое число рецепторов EGF. Под влиянием экзогенного EGF наблюдали резкое изменение поведения клеток типа С, которые вместо астроцитоподобных клеток начинали образовывать клетки с измененной цитоплазмой [Doetsch, et al., 2002]. В отличие от EGF, экзогенный FGF2 повышал нейрогенез в обонятельной луковице. У мышей с недостатком FGF2 выявили снижение пролиферации в SEZ и нейрогенеза в обонятельной луковице [Zheng, et al., 2004];

2) сигнальный фактор Notch. Сигналы, поступающие через рецепторы Notch, подавляют нейрогенез [Tanigaki, et al., 2001] и блокируют дифференцировку нейронов [Ohtsuka, et al., 1999]. По данным некоторых авторов, временная активация Notch в клетках нервного гребня, вызванная его экзогенным лигандом, приводила к быстрой и необратимой утрате нейрогенной способности и ускоренной дифференцировке в глию [Morrison, et al., 1997]. У мышей с дефицитом Notch1 или ключевых регуляторов активности Notch, таких как, например, пресенилин, выявляли истощение клеток, образующих нейросферы [Ohtsuka, et al., 2001]. При усиленной экспрессии Notch1 в переднем мозгу эмбриона мыши, вызванной трансдукцией ретровируса,

обнаружили приобретение клетками морфологических и молекулярных характеристик радиальной глии [Gaiano, et al., 2000]. В настоящее время считается признанным, что в развивающемся мозге пролиферирующая радиальная глиа функционирует в качестве нейральных предшественников [Malatesta, et al., 2003; Noctor, et al., 2001]. Поэтому данные, что активированный сигнал Notch индуцирует в ранних нейральных предшественниках фенотип радиальной глии, согласуются с возможностью, что этот сигнал скорее сохраняет клетки в состоянии предшественников, чем способствует их конечной дифференцировке в астроциты. Во время постнатального развития многие перегруженные Notch клетки в конце концов становятся перивентрикулярными астроцитами, т. е. клетками типа В [87, Gaiano, et al., 2000];

3) костные морфогенетические белки (BMP). Наиболее примечательным свойством нейрогенных ниш SEZ и SGZ является возможность осуществления в них нейрогенеза, в отличие от всех других регионов ЦНС взрослых млекопитающих. Один из молекулярных механизмов, лежащих в основе этого свойства, предполагает причастность к созданию нейрогенной ниши в SEZ местного антагонистического взаимодействия между ноггин (или родственными ему молекулами) и различными BMP [Lim, et al., 2000]. Внутри SEZ отмечается выраженная экспрессия BMP-2, BMP-4 и BMP-7, особенно в астроглиальных клетках, т. е. в клетках типа В [Peretto, et al., 2004]. Основная функция этих BMP — подавлять нейрогенез и способствовать астроглиальной судьбе клеток как *in vivo*, так и *in vitro* [обзор 87]. Это антинейрогенное действие BMP препятствует местной секреции из эпендимарных клеток и, возможно, также из клеток типа В ноггина — антагониста BMP [Lim, et al., 2000; Peretto, et al., 2004]. Ноггин противодействует эффектам BMP, связывается с этими белками и нейтрализует их, предупреждая тем самым сигнальный каскад, возникающий при связывании BMP с рецепторами [75]. Так как ноггин и BMP присутствуют в ростральном миграционном потоке [Gritti, et al., 2002], предполагают, что этот поток не только может доставлять клетки в обонятельную луковицу, но еще и укрывать СК и быть местом нейрогенеза;

4) Sonic Hedgehog (Shh). Shh-молекулы, которые выполняют функции моделирования во время развития и способствуют клеточной пролиферации наружных гранулированных клеток мозжечка. Эти молекулы влияют также на пролиферацию клеток в SGZ и SEZ, действуя не только на транзиторные амплифицирующиеся предшественники, но и на GFAP-позитивные клетки, т. е., вероятно, на НСК SVZ. После обработки циклофамином, ингибитором сигнала Shh, наблюдается снижение включения BrdU в SEZ и значительное уменьшение числа новообразованных гранулированных нейронов в обонятельной луковице [обзор 87];

5) внутренние молекулярные факторы. Пока представления о внутренних молекулярных механизмах, ответственных за поддержание пула НСК и определение их судьбы, фрагментарны. Молекулы, регулирующие специфическое самообновление, остаются неуловимыми, но много факторов влияет на пролиферацию взрослых нейральных предшественников, демонстрируя наличие жесткого контроля этого параметра [87]. Ряд важных сведений был получен на основании изучения подобных процессов во время развития. Эти исследования показали, что ряд транскрипционных регуляторов вовлекается в определение судьбы нейральной клетки в развивающейся ЦНС. Некоторые из этих регуляторов, такие как, например, фактор транскрипции Pax6 и факторы транскрипции Olig2 и Mash1, обнаруживаются у взрослых в зонах нейрогенеза [обзор 87]. Пронейрогенный фактор Mash1 необходим для образования нейрональных предшественников в телэнцефалоне. У взрослых Mash1 преимущественно экспрессирован в транзиторных амплифицирующихся клетках SEZ и в меньшей степени в нейробластах. После обработки антимиотическим препаратом Ara-C (цитозин-В-D-арабинофуранозидом) наблюдали истощение Mash1-позитивных клеток. Так как мыши-мутанты Mash1 погибают при рождении, прямого доказательства пронейрогенной функции этого фактора нет. Вместе с тем, у новорожденных мышей-мутантов Mash1 обнаружили резкое снижение нейронов в гранулярном слое обонятельной луковицы. Предполагают, что у взрослых Mash1 участвует в образовании гранулированных нейронов SEZ.

Экспрессия Рах6 обнаруживается в клетках типа А. У взрослых животных при снижении нормальной функции Рах6 в SEZ наблюдали резкое подавление нейрогенеза предшественников. Примечательно, что в постмитотических нейронах обонятельной луковицы экспрессия Рах6 не обнаруживается, за исключением субпопуляции постмитотических перигломерулярных нейронов, которые экспрессируют дофамин в качестве нейротрансмиттера. Искусственное повышение экспрессии Рах6 в новообразованных нейронах вызывало превращение их в дофаминергические клетки. Авторы работы [87] предполагают двойственную модель действия Рах6 в определении судьбы нервной клетки: одна — включается, когда клетки-предшественники только специализируются к нейрогенной судьбе, а другая, последующая — связана с дифференцировкой субпопуляции в дофаминергический фенотип.

10.5. Пластичность нейральных стволовых клеток

Поскольку СК подвергаются изменениям в процессе развития, НСК взрослых могут отличаться от НСК плодов и быть позиционно и временно специализированы [729]. По данным Сухих Г.Т. [34], в течение 1-го триместра беременности нервная ткань млекопитающих (в том числе человека) на 90 % состоит из нейрогенных стволовых и прогениторных клеток. Один из способов исследования пластичности СК нервной системы заключается в трансплантации их в бластоцисту животных на доимплантационной стадии развития с последующим исследованием появляющихся клеток. Такую работу провели Harder и соавторы [295] и установили, что аллогенные НСК млекопитающих могут вызывать образование клеток-предшественников эритроидного ряда, которые во время онтогенеза дифференцируются в клетки, экспрессирующие глобин и эритроцитспецифические поверхностные маркеры. Этот вывод авторов, согласующийся с более ранними наблюдениями дифференцировки НСК в ГСК [117, 491], до сих пор вызывает оживленную дискуссию. Одни авторы подтверждают такую возможность [Filip, et al., 2004], другие — [Yusta-Boyo, et al., 2004] сомневаются в ней. Повод для сомнений дало наблюдение, что НСК, выделенные из ткани обонятельной луковицы зародышей мыши и трансплантированные в хвостовую вену облученных животных того же вида, не образовывали клеток кроветворного ряда, хотя нейрогенный потенциал сохраняли. Авторы [Yusta-Boyo, et al., 2004] заключили, что эти данные подтверждают мнение о рестрикции (ограничении свойств) НСК обонятельной луковицы.

Установлено, что НСК млекопитающих, наряду с нейрогенным потенциалом, обладают также миогенным потенциалом, поскольку меченые ядра потомков трансплантированных клеток обнаруживались среди регенерирующих волокон поперечнополосатых мышечных тканей [256]. Эксперименты со СК ЦНС взрослых, подвергнутыми экспансии в культуре, показывают, что иногда измененная пластичность этих клеток может формироваться *in vitro* под влиянием факторов окружающей среды. По данным Wurmser и др. [808], около 6 % зрелых НСК мыши при культивировании с летально поврежденными эндотелиоцитами экспрессируют маркеры эндотелиальных клеток и образуют сеть капилляров. Последующее кариотипирование показало, что трансдифференцировка в данном случае проходила без спонтанного слияния клеток. При совместном культивировании НСК с миообластами (клеточная линия C2C12) нейрогенные клетки могут дифференцироваться в миоциты, активно синтезирующие тяжелые цепи миозина и формирующие миотрубочки [Rietze, et al., 2001].

Возможности изучения пластичности СК нервной системы, вероятно, безграничны, но такой подход требует применения безупречных методов выделения этих клеток из участков их компактного расположения в ткани зрелого мозга или зародыше и тщательной визуализации потомков НСК после трансплантации для определения их дальнейшей судьбы. Данные литературы по этой проблеме, охватывающие нейрогенные клетки разных отделов головного и спинного мозга млекопитающих, полно представлены в монографиях украинских авторов, опубликованных в 2004–2005 годах [11, 12, 16, 37].

10.6. Трансплантация НСК животным с повреждениями головного или спинного мозга

В работах Bjorklund и др. было установлено, что трансплантаты нервной ткани плода способны нормализовать моторную функцию взрослых крыс, имеющих симптомы заболевания, напоминающие болезнь Паркинсона у человека [Bjorklund, Stenevi, 1977; 1979]. Трансплантация НСК показала обещающие результаты при применении на мышах с гипоксическим повреждением (инсультом) мозга. После введения НСК в мозг таких животных в патологических очагах выявляли приживание клеток с экспрессией в них генов пораженного региона [Park, 2000]. НСК мигрировали преимущественно в места ишемии, проявляли умеренную пролиферацию и дифференцировались в нервные клетки. Эти клетки могли замещать не только нейроны, но также клетки глии, включая олигодендроциты [Brustle, et al., 1998]. Трансплантация аллогенных НСК приводила также к усилению естественного процесса самообновления, при котором поврежденная ЦНС пыталась мобилизовать свой собственный запас СК [Fallon, et al., 2000]. Этот механизм, довольно совершенный у низших позвоночных, в процессе эволюции был снижен, возможно, для противодействия злокачественной трансформации внутри активных пулов СК. Предполагают, что обеспечение дополнительного содержания НСК и трофических факторов может повысить восстановительный потенциал не только при повреждениях ЦНС и спинного мозга [491, 492], а также сетчатки глаза [Young, et al., 2000; Pressmar, et al., 1991; Warfvinge, et al., 2001], волосковых клеток внутреннего уха [Hu, et al., 2004] и других органов.

В то же время было установлено, что НСК обладают способностью самообновляться и дифференцироваться в основные типы нервной ткани, т.е. — нейроны, астроциты и олигодендроциты [158, 256]. После повреждения отмечается повышение скорости пролиферации НСК в обонятельной луковице. Их потомки мигрируют в места повреждения, в которых они дифференцируются в астроциты [Johansson, et al., 1999].

Зоны терапевтического воздействия при тяжелых повреждениях спинного мозга часто трудно определить. Травма спинного мозга разрушает многочисленные типы клеток, включая нейроны, которые осуществляют сигнальную связь между мозгом и остальным телом. При многих повреждениях спинного мозга мозг не разъединен и, по крайней мере, некоторые нейрональные аксоны, передающие сигналы, остаются интактными. Однако часто эти выжившие аксоны не могут передавать сигналы, потому что потеряны олигодендроциты, образующие миелиновую оболочку аксонов. Недавно исследователи добились успехов в восполнении утраченных миелинообразующих клеток [Liu, et al., 2000]. Авторы культивировали ЭСК человека, чтобы получить смешанные культуры, содержащие олигодендроциты. После введения этих клеток в спинной мозг демиелинизированных крыс наблюдали восстановление функции задних конечностей животных. Но, хотя миелин способствует нормальной нейрональной функции, он подавляет рост новых аксонов после повреждения спинного мозга. Harper и др. [Harper, et al., 2004], пытаясь добиться роста аксонов после травмы, обрабатывали ЭСК смесью факторов, способствующих дифференцировке моторных нейронов. Затем эти клетки трансплантировали взрослым крысам, получившим повреждение спинного мозга. Хотя многие из этих клеток выживали и дифференцировались в нейроны, они не образовывали аксоны до тех пор, пока исследователи не стали добавлять препараты, препятствующие ингибиторному действию миелина. Хотя пролиферативный эффект был умеренный и доказательства связи нейронов не были получены, авторам удалось установить, что соединение нейронов и их функционирование зависят от точного включения сигналов [Harper, et al., 2004].

Другие исследователи [Nistor, et al., 2005; 129] также культивировали ЭСК человека со смесью ростовых факторов, чтобы получить высокообогатленную популяцию миелинизирующих предшественников олигодендроцитов. Затем эти клетки были введены мышам-мутантам с нарушенным образованием миелина. Была выявлена миграция клеток и их дифференцировка в зрелые олигодендроциты, образующие миелиновые оболочки вокруг близлежащих аксонов.

При трансплантации крысам с поврежденным спинным мозгом эти клетки созревали и восстанавливали движение животных [Keirstead, et al., 2005]. Однако положительные результаты отмечались только в тех случаях, когда трансплантацию проводили вскоре после повреждения. Авторы предположили, что действию пересаженных клеток могут препятствовать реакции, развивающиеся после повреждения.

10.7. Проблемы восстановления нервной функции при нейродегенеративных заболеваниях

В последние 25 лет возникла область клеточной трансплантологии, ставящая своей целью лечение тяжелых заболеваний нервной системы у человека (болезней Паркинсона, Гентингтона, Альцгеймера) и повреждений головного и спинного мозга [Armstrong, et al., 2000; Sugaya, Brannen, 2001; Storch, Schwarz, 2002 Bjorklund, et al., 2003]. Результаты этих исследований, подробно изложенные в отечественных монографиях [11, 12, 16, 37], предполагают наличие у НСК потенциала для дифференцировки в нейральные клеточные типы внутри поврежденной зрелой нервной системы.

В рамках клинических пилотных испытаний в центрах Европы и Америки с 1987 по 2004 гг. до 250 больных с начальной болезнью Паркинсона получили трансплантаты мезенцефалической ткани (средний мозг) плодов человека 6–9 недель, содержащей дофаминергические нейробласты [Klassen, et al., 2004]. Обоснованием для проведения этих клинических испытаний служили многочисленные доклинические исследования, свидетельствующие о способности фетальных предшественников substantia nigrae после трансплантации в мозг человека развиваться в зрелые дофаминовые нейроны. Результаты этих работ продемонстрировали эффективность трансплантации, но определенно много меньшую, чем ожидалась [Park, 2000; 129].

Главным недостатком метода трансплантации фетальных мезенцефалических клеток является низкая выживаемость (5–20 %) трансплантированных клеток [Klassen, et al., 2004], что требовало заготовки большого количества материала. Так, для пересадки в одно полушарие больных болезнью Паркинсона были необходимы фрагменты среднего мозга 6–8 плодов [Klassen et al., 2004]. К тому же, при применении этой методики возникают этические, иммунологические и организационные проблемы.

Многие исследователи предполагают, что наилучшим источником дофаминовых нейронов являются ЭСК, потому что они способны дифференцироваться в любой тип клеток. Было показано, что после трансплантации ЭСК приобретают специфичность нейральных клеток, подвергаются дифференцировке и включаются в функцию окружающей ткани [98; Doetsch, et al., 2002]. Тот факт, что пересаженные нейроны, происходящие из ЭСК, легко вовлекаются в систему синаптической передачи в ткани хозяина, рассматривается как очень благоприятный для экспериментальных исследований, однако трудно определить, каким он будет для больного [87].

Нейроны, которые были получены из ЭСК и перенесены в культуры гиппокампа, проявляли глутаматергический или ГАМКергический механизмы синаптической передачи [98]. Однако в глутаматергических синапсах, установившихся в этих нейронах, отмечалось отсутствие компонента, опосредованного рецепторами N-метил-D-аспартата (NMDA). Это свидетельствует о том, что полученные нейроны в функциональном отношении не являются полноценной копией эндогенных нейронов. Принимая во внимание, что рецепторы NMDA играют роль в долговременных синаптических связях, отсутствие одного из их компонентов могло быть причиной того, что пересаженные нейроны не выполняли свою функцию надлежащим образом. Для преодоления подобного нарушения дифференцировки ЭСК в тканях хозяина надо было индуцировать приобретение этими клетками необходимого специфического фенотипа. Были разработаны методики, которые гарантировали избирательное образование различных типов нейронов, например, таких как дофаминергические и серотонинергические нейроны среднего мозга [258; Perrier, et al., 2004; Kim, et al., 2003], холинергические моторные [775] и глутаматергические нейроны [Bibel, et al., 2004; Watanabe, et al., 2005]. Применение этих методик основывалось

на предположении, что ЭСК могут превращаться в любой желаемый тип нейронов при экспозиции с теми сигналами, которые причастны к специализации этих клеточных типов во время эмбриогенеза.

В настоящее время известно, что нейроны, растущие при относительно высоких концентрациях Shh (см. Главу 4), экспрессируют факторы транскрипции, типичные для моторных нейронов. После трансплантации в куриный эмбрион моторные нейроны, происходящие из клеток, обработанных ретиноевой кислотой и Shh, демонстрировали рост аксонов по периферии, имитирующий иннервацию мышечной ткани. При достижении мишеней моторные нейроны, происходящие из ЭСК, проявляли признаки холинергической пресинаптической дифференцировки, предполагающей образование концевых пластинок двигательных нервов. После трансплантации в спинной мозг развивающегося цыпленка такие ЭСК превращались в моторные нейроны [Plachta, et al., 2004].

Подобный же подход был использован исследователями для получения из ЭСК дофаминергических нейронов [Kim, et al., 2003; Perrier, et al., 2004]. Во время эмбрионального развития сигнальный центр, локализующийся на границе среднего и заднего мозга, посылает сигналы, такие как FGF8 и Shh, которые инструктируют находящихся в роstralном потоке клеток-предшественников к установлению дофаминергического фенотипа. Была разработана методика для дифференцировки ЭСК человека с получением высокого выхода дофаминергических нейронов мезенцефалона [Perrier, et al., 2004]. При культивировании на фидерном слое стромальных клеток ЭСК человека развивались в нейрогенном направлении и образовывали нейроэпителиальные структуры, состоящие из клеток-предшественников, экспрессирующих Sox1 и Pax6. Для получения глутаматергических нейронов ЭСК культивировались без фидерного слоя, но с добавлением ретиноевой кислоты [Bibel, et al., 2004]. В этих условиях клетки начинали экспрессировать маркеры радиальной глии, такие как нестин, RC2, GLAST, и почти все они экспрессировали Pax6. В процессе эмбриогенеза Pax6-позитивные клетки радиальной глии являются, в основном, предшественниками глутаматергических нейронов и лишь небольшая их часть ГАМКергическими [Heins, et al., 2002; Malatesta, et al., 2003]. При трансплантации этих клеток в эмбриональную нервную трубку они мигрируют также как клетки нейрального гребня и заселяют ганглии дорсального корешка. Авторы работы [Watanabe, et al., 2005] разработали метод получения нейронов переднего мозга из ЭСК, который исключал применение ретиноевой кислоты. Было показано, что блокирование сигнала Wnt (путем применения эндогенного антагониста Wnt Dkk1) и сигнала Nodal способствует нейрогенной дифференцировке ЭСК. Примечательно, что предшественники, обработанные Dkk1, экспрессировали Foxg1 — маркер телэнцефалических нейронов. При достижении этой стадии активация сигнала Wnt (добавлением Wnt3a) индуцировала экспрессию Pax6, предполагая спецификацию в дорсальные телэнцефалические клетки. Напротив, обработка фактором Shh индуцировала экспрессию вентральных телэнцефалических маркеров, таких как Islet1. Таким образом, выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе специализации нейральных предшественников, может обеспечить в будущем получение из ЭСК любого желаемого типа нейральных клеток. Однако для функционального включения нейронов, происходящих из ЭСК, необходимо обеспечение должного типа синаптических связей с соседними клетками, что еще требует разработки [87].

Введение в мозг крысам, обработанным 6-гидроксидофамином, повреждающим substantia nigrae, ЭСК мышей приводило к исчезновению симптомов болезни Паркинсона. Дальнейшие исследования показали, что эти ЭСК дифференцируются не только в дофаминовые нейроны, а также в серотониновые нейроны, образующиеся в соседнем регионе мозга [98], и вообще могут образовать все возможные, но в данном случае нежелательные типы клеток: костные, мышечные и т. д. В связи с этим большое внимание уделяется разработке способа направленной дифференцировки ЭСК в дофаминовые нейроны. Ученые Института нейрохирургии АМН Украины на протяжении последних 10 лет занимаются изучением эффективности трансплантации эмбриональной нервной ткани и ее производных в лечении ряда нейродегенеративных за-

болеваний и последствий ишемического повреждения. Обширный материал по этим проблемам представлен ими в монографиях, о которых уже упоминалось [12, 37].

Для лечения дегенеративных заболеваний ЦНС применяли также клетки стромы аутологичного КМ, возможность дифференцировки которых в нервные клетки под влиянием специфических индукторов была установлена предварительно [586, 641, 784]. Были получены доказательства того, что СК, происходящие из КМ, могут образовать в мозговой ткани новые нейроны и глию [222], а также эндотелиальные клетки сосудов и расширять капиллярную сеть ЦНС [192]. Украинские и белорусские авторы также показали дифференцировку *in vitro* клеток КМ под действием ретиноевой кислоты или ростовых факторов (FGF и EGF) в клетки-предшественники нейронов [39, 40, Шахбазов А. В. и др., 2009, Щегельская Е. А. и др., 2002]. У крыс с травмой головного мозга, моделированной криогенной аппликацией, после трансплантации клеток стромы КМ, индуцированных в нейробласты, наблюдали восстановление морфологической структуры поврежденного мозга и двигательной активности [24]. После эндолюмбальной или интрацеребральной аутотрансплантации больным с болезнью Паркинсона или рассеянным склерозом СК из стромы КМ, дифференцированных в нейрональные клетки, выявляли улучшение неврологического статуса больных [6]. Однако следует заметить, что в некоторых недавних работах возможность дифференцировки СК КМ в нейрональные клетки оспаривается [Wehner, et al., 2003]; и приведенные выше данные, вероятно, должны быть пересмотрены в свете данных о слиянии клеток [766, 767].

Новые перспективы в лечении больных дегенеративными заболеваниями ЦНС открылись после того, как Reynolds и Weiss [634] и Bartlett [81] сообщили об успешном размножении НСК в культурах *in vitro*. Изучение результатов клинического применения выращенных НСК представляет огромный интерес. НСК были опробованы в лечении ряда тяжелых заболеваний нервной системы у человека: болезнью Паркинсона, Гентингтона, Альцгеймера, а также повреждений спинного мозга на животных моделях [Armstrong, et al., 2000; Sugaya & Brannen, 2001; Storch & Schwarz, 2002; Bjorklund, et al., 2003]. Результаты этих исследований, подробно изложенные в отечественных монографиях [11, 12, 16, 37], предполагают наличие у НСК взрослых потенциала для дифференцировки в нейральные клеточные типы внутри поврежденной зрелой нервной системы. НСК предпочтительнее дифференцируются в астроциты как *in vitro*, так и при трансплантации. Но в последнее десятилетие были разработаны несколько молекулярных методов, способных стимулировать нейрогенную дифференцировку во время развития. Например, трансдукция СК перед имплантацией геном, способствующим дифференцировке в нейроны (нейрогенин 2), повышает образование прогениторных клеток из краниального сенсорного ганглия [Fode, et al., 1998; Ma, et al., 1999]. Трансдукция НСК нейрогенином 2 обеспечивала *in vitro* дифференцировку 95 % этих клеток в нейроны [Falk, et al., 2002].

10.8. Активация резидентных стволовых клеток мозга для лечения нейродегенеративных заболеваний

Этот метод, находящийся на ранней стадии своего развития, подразумевает применение лекарственных препаратов, которые могут стимулировать образование новых нейронов из собственных резидентных СК мозга. Тот факт, что клетки, образующие нейросферы, могут быть выделены, кроме SEZ и SGZ, из различных отделов мозга [Weiss, et al., 1996; Johansson, et al., 1999], предполагает, что ЦНС может содержать резервные СК или клетки-предшественники во многих регионах. Эти клетки могут быть стимулированы к образованию нейронов в случае заболевания или нейродегенеративного процесса, вызванного травмой. Возможность активации нейрогенной программы восстановления, вызванной дегенеративным процессом, была установлена исследованиями Magavi и его соавторов [Magavi, et al., 2000]. Эти авторы вызывали гибель нейронов кортикоталамического слоя VI обработкой хромофорами. Хотя в интактной коре нейрогенез не обнаруживался, в пораженном участке выявляли новообразованные клетки, проявляющие наличие BrdU и нейронального маркера Neu N, и простирающие длинные аксоны к таламусу. Подобные же данные получили при очаговой дегенерации нейронов пирамидного

пути [Chen, et al., 2004]. В обоих случаях было установлено местное образование нейронов, хотя нельзя было исключить миграцию молодых нейронов из SEZ через мозолистое тело. На модели экспериментального инсульта наблюдали подобную мобилизацию предшественников нейронов в пораженный взрослый стриатум (полосатое тело) [Arvidsson, et al., 2002]. К сожалению, большинство местно новообразованных нейронов характеризовались коротким временем жизни, что неудивительно, так как они локализованы в крайне неблагоприятном окружении.

Способность мозга взрослых к самообновлению была изучена, исследуя реакцию мозга взрослой крысы на TGF- α -фактора, важного для раннего развития мозга, но присутствующего в небольшом количестве у взрослых [Fallon, et al., 2000]. После инъекции TGF- α в ткань мозга взрослой здоровой крысы выявляли на протяжении нескольких дней деление СК. У крыс, обработанных гидроксидофамином, вызывающим гибель дофаминовых нейронов и появление симптомов, подобных болезни Паркинсона, также отмечали пролиферацию клеток и миграцию их в очаги поражения. Авторы [Craig, et al., 1996; Kuhn, et al., 1997] после введения EGF или FGF-2 внутрь желудочков мозга грызунов наблюдали *in vivo* стимуляцию пролиферации и миграции субэпендимарных клеток. Но каждый из этих ростовых факторов воздействовал на судьбу клеток различно. Введение FGF-2 вызывало увеличение числа нейронов, особенно в обонятельной луковице. Напротив, EGF стимулировал появление глиальных клеток, как астроцитов, так и олигодендроцитов, но не влиял на образование нейронов.

Наиболее яркий пример замещения дегенеративных нейронов новообразованными клетками представлен в работе Nakatomi и др. [Nakatomi, et al., 2002]. У животных с моделью инсульта, который вызывал общую потерю пирамидальных нейронов CA1, обнаружили спонтанную, но очень небольшую репопуляцию в зоне поражения. Массовое восстановление нейронов стимулировали введением через желудочки мозга ростовых факторов EGF и FGF2. Вновь были получены доказательства мобилизации нейрональных клеток-предшественников с наружной стороны пораженного региона, а именно со стороны перивентрикулярной зоны. Морфологическое восстановление у животных, обработанных ростовыми факторами, сопровождалось функциональным улучшением.

Таким образом, мобилизация эндогенных нейрогенных предшественников зависит от оказавшихся в наличии сигналов. Далее было показано [Saghatelian, et al., 2004], что мигрирующие нейробласты могут быть извлечены из рострального миграционного потока белком экстраклеточного матрикса тенасцином-R. Этот белок играет большую роль внутри обонятельной луковицы, иницируя отделение нейробластов и вызывая радиальную миграцию. Эктопическая экспрессия тенасцина-R внутри полосатого тела вызывала рассеивание мигрирующих нейробластов по всей ткани, способствуя мобилизации этих клеток в зоны поражения, которую не могли обеспечить собственные сигналы. Ясно, что чем больше мы будем знать о свойствах НСК и их потомков, тем больше получим средств воздействия на эти клетки для возможно полного использования их потенциала.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Шахбазов А. В., Гончарова Н. В., Космачева С. М., et al., Пластичность фенотипа и профиля экспрессии мезенхимальных стволовых клеток человека в нейрогенных условиях // БЭБиМ. — 2009. — Т. 147, 4. — С. 513–516.

Щегельская Е. А., Микулинский Ю. Е., Ревущин А. В., et al., Индуцированная дифференцировка клеток стромы костного мозга мыши в нервные клетки // Цитология. — 2002. — Т. 44, № 7. — С. 637–641.

Altmann C. R., Brivanlou A. H. Neural patterning in the vertebrate embryo // Int. Rev. Cytol. — 2001. — Vol. 203. — P. 447–482.

Altman J., Das G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats // J. Comp. Neurol. — 1965. — Vol. 124. — P. 319–335.

Alvarez-Buylla A., Lim D. A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain // Neuron. — 2004. — Vol. 41. — P. 683–686.

- Anderson D.J., Groves A., Lo L., et al.* Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. — 1997. — Vol. 62. — P. 493–504.
- Armstrong R.J., Watts C., Svendsen C.N., et al.* Survival, neuronal differentiation, and fiber outgrowth of propagated human neural precursor grafts in an animal model of Huntington's Disease // Cell Transplant. — 2000. — Vol. 9. — P. 55–64.
- Arsenijevic Y., Villemure J.G., Brunet J.F., et al.* Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain // Exp. Neurol. 2001. — Vol. 170. — P. 48–62.
- Arvidsson A., Collin T., Kirik D., et al.* Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke // Nat Med. — 2002. — Vol. 8. — P. 963–970.
- Azizi S.A., Stokes D., Augelli B.J., et al.* Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats — similarities to astrocyte grafts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 3908–3913.
- Barry F., Boynton R., Murphy M., et al.* The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2001. — Vol. 289. — P. 519–524.
- Bibel M., Richter J., Schrenk K., et al.* Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage // Nat. Neurosci. — 2004. — Vol. 7. — P. 1003–1009.
- Bjorklund A., Stenevi U.* Reformation of the severed septohippocampal cholinergic pathway in the adult rat bytransplanted septal neurons // Cell Tissue Res. — 1977. — Vol. 185 (3). — P. 289–302.
- Bjorklund A., Stenevi U.* Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants // Brain Res. — 1979. — Vol. 177, N.3. — P. 555–560.
- Bjorklund A., Dunnett S.B., Brundin P., et al.* Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease // Lancet Neurol. — 2003. — Vol. 2. — P. 437–445.
- Blesch A., Lu P., Tuszynski M.H.* Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair // Brain Res. Bull. — 2002. — Vol. 57. — P. 833–838.
- Brustle O., Choudhary K., Karram K., et al.* Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats // Nat/Biotechnol. — 1998. — Vol. 16, 11. — P. 1040–1044.
- Cameron H.A., Hazel T.G., McKay R.D.* Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters // J. Neurobiol. — 1998. — Vol. 36. — P. 287–306.
- Campbell K., Gotz M.* Radial glia: multi-purpose cells for vertebratebrain development // Trends Neurosci. — 2002. — Vol. 25. — P. 235–238.
- Check E.* Parkinson's transplant therapy faces setback // Nature. — 2003. — Vol. 424, 6952. — P. 987.
- Chen J., Magavi S.S., Macklis J.D.* Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101. — P. 16357–16362.
- Craig C.G., Tropepe V., Morshead C.M., et al.* In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain // J.Neurosci. — 1996. — Vol. 16. — P. 2649–2658.
- Davis A.A., Temple S.* A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex // Nature. — 1994. — Vol. 372. — P. 263–266.
- Doetsch F., Petreanu L., Caille I., et al.* EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells // Neuron. — 2002. — Vol. 36. — P. 1021–1034.
- Doetsch F.* The glial identity of neural stem cells // Nat. Neurosci. — 2003. — Vol. 6. — P. 1127–1134.
- Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus // Nat. Med. — 1998. — Vol. 4. — P. 1313–1317.
- Falk A., Holmstrfn N., Carlen M., et al.* Gene delivery to adult neural stem cells // Exp. Cell Res. — 2002. — Vol. 279. — P. 34–39.
- Fallon J., Reid S., Kinyamu R., et al.* In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, 26. — P. 14686–14691.

- Filip S., Mokry J., Karbanova J., et al.* Local environmental factors determine hematopoietic differentiation of neural stem cells // *Stem Cells Dev.* — 2004. — Vol. 13, 1. — P. 113–120.
- Fode C., Gradwohl G., Morin X., et al.* The bHLH protein neurogenin 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons // *Neuron.* — 1998. — Vol. 20. — P. 483–494.
- Frisen J., Johansson C.B., Lothian C., et al.* Central nervous system stem cells in the embryo and adult // *Cell. Mol. Life Sci.* — 1998. — Vol. 54. — P. 935–945.
- Gaiano N., Nye J.S., Fishell G.* Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain // *Neuron.* — 2000. — Vol. 26. — P. 395–404.
- Gritti A., Bonfanti L., Doetsch F., et al.* Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents // *J Neurosci.* — 2002. — Vol. 22. — P. 437–445.
- Hack M.A., Sugimori M., Lundberg C., et al.* Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6 // *Mol. Cell. Neurosci.* — 2004. — Vol. 25. — P. 664–678.
- Harper J.M., Krishnan C., Darman J.S., et al.* Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 7123–7128.
- He W., Ingraham C., Rising L., et al.* Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis // *J Neurosci.* — 2001. — Vol. 15, 21(22). — P. 8854–8862.
- Heins N., Malatesta P., Cecconi F., et al.* Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6 // *Nat. Neurosci.* — 2002. — Vol. 5. — P. 308–315.
- Hu Z., Ulfendahl M., Olivius N.P.* Survival of neuronal tissue following xenograft implantation into the adult rat inner ear // *Exp. Neurol.* — 2004. — Vol. 185. — P. 7–14.
- Imitola J., Raddassi K., Park K.I., et al.* Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 α /CXC chemokine receptor 4 pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101, 52. — P. 18117–18122.
- Isshiki T., Pearson B., Holbrook S., et al.* Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny // *Cell.* — 2001. — Vol. 106. — P. 511–521.
- Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., et al.* Identification of a neural stem cells in the adult mammalian central nervous system // *Cell.* — 1999. — Vol. 96. — P. 25–34.
- Johansson C.B., Svensson M., Wallstedt L., et al.* Neural stem cell in the adult human brain // *Exp. cell Research.* — 1999. — Vol. 253. — P. 733–736.
- Kalyani A., Hobson K., Rao M.S.* Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis // *Dev. Biol.* — 1997. — Vol. 186. — P. 202–223.
- Kalyani A.J., Piper D., Mujtaba T., et al.* Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture // *J. Neurosci.* — 1998. — Vol. 18. — P. 7856–7868.
- Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S., et al.* Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity // *Neuron.* — 2000. — Vol. 28. — P. 31–40.
- Keirstead H.S., Nistor G., Bernal G., et al.* Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury // *J Neurosci.* — 2005. — Vol. 25, 19. — P. 4694–4705.
- Kilpatrick T.J., Bartlett P.F.* Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF // *J. Neurosci.* — 1995. — Vol. 15. — P. 3653–3661.
- Kim J.Y., Koh H.C., Lee J.Y., et al.* Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression // *J. Neurochem.* — 2003. — Vol. 85. — P. 1443–1454.
- Klassen H., Sakaguchi D.S., Young M.J.* Stem cells and retinal repair // *Progress in Retinal and Eye Research.* — 2004. — Vol. 23. — P. 149–181.
- Kuhn H.G., Winkler J., Kempermann G., et al.* Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain // *J. Neurosci.* — 1997. — Vol. 17. — P. 5820–5829.

Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O., et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain // *Exp Neurol.* — 1999. — Vol. 156. — P. 333–344.

Lie D.C., Dziejczapolski G., Willhoite A.R., et al. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential // *J. Neurosci.* — 2002. — Vol. 22. — P. 6639–6649.

Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M., et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis // *Neuron.* — 2000. — Vol. 28. — P. 713–726.

Liu S., Qu Y., Stewart T.J., et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 6126–6131.

Ma Q., Fode C., Guillemot F., et al. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia // *Genes Dev.* — 1999. — Vol. 13. — P. 1717–1728.

Magavi S.S., Leavitt B.R., Macklis J.D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice // *Nature.* — 2000. — Vol. 405. — P. 951–955.

Malatesta P., Hack M.A., Hartfuss E., et al. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate // *Neuron.* — 2003. — Vol. 37. — P. 751–764.

Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology // *Cell.* — 1997. — Vol. 88. — P. 287–298.

Mujtaba T., Mayer-Proschel M., Rao M. S. A common neural progenitor for the CNS and PNS // *Dev. Biol.* — 1998. — Vol. 200. — P. 1–15.

Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors // *Cell.* — 2002. — Vol. 110. — P. 429–441.

Nistor G.I., Totoiu M.O., Haque N., et al. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation // *Glia.* — 2005. — Vol. 49, 3. — P. 385–396.

Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., et al. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex // *Nature.* — 2001. — Vol. 409. — P. 714–720.

Ohtsuka T., Ishibashi M., Gradwohl G., et al. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation // *EMBO J.* — 1999. — Vol. 18. — P. 2196–2207.

Ohtsuka T., Sakamoto M., Guillemot F., et al. Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain // *J Biol Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 30467–30474.

Olsson M., Campbell K., Turnbull D.M. Specification of mouse telencephalic and mid-hindbrain progenitors following heterotopic ultrasound graded embryonic // *Neuron.* — 1997. — Vol. 19. — P. 761–772.

Palmer T.D., Ray J., Gage F.H. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain // *Mol. Cell. Neurosci.* — 1997. — Vol. 6. — P. 474–486.

Palmer T.D., Takahashi J., Gage F.H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells // *Mol. Cell. Neurosci.* — 1997. — Vol. 8. — P. 389–404.

Panchision D.M. Repairing the nervous system with stem cells // *Regenerative Medicine.* — 2006. — P. 35–43.

Panicker M.M., Rao M. Stem cells and Neurogenesis // *Stem cell Biology*, Eds. By Marshak D.R., et al., Cold Spring Harbor Lab Press. — 2004. — P. 399–438.

Park K.I. Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury // *Yonsei Med. J.* — 2000. — Vol. 41. — N. 6. — P. 825–835.

Peretto P., Dati C., De Marchis S., et al. Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain // *Neuroscience.* — 2004. — Vol. 128. — P. 685–696.

Perrier A.L., Tabar V., Barberi T., et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 12543–12548.

Plachta N., Bibel M., Tucker K.L., et al. Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells // *Development*. — 2004. — Vol. 131. — P. 5449–5456.

Pressmar S., Ader M., Richard G., et al. The fate of heterotopically grafted neural precursor cells in the normal and dystrophic adult mouse retina // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* — 1991. — Vol. 42. — P. 3311–3319.

Price J., Williams B. Neural stem cells // *Curr. Opin. Neurobiol.* -2001. -Vol. 11. — P. 564–587.

Qian X., Shen Q., Goderie S.K., et al. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells // *Neuron*. — 2000. — Vol. 28. — P. 69–80.

Rao M.S. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system // *Anat. Rec.* — 1999. — Vol. 257. — P. 137–148.

Rietze R.L., Valcanis H., Brooker G.F., et al. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain // *Nature*. — 2001. — Vol. 412. — P. 736–739.

Rosser A.E., Dunnett S.B. Neural transplantation in patients with Huntington's disease // *CNS Drugs*. — 2003. — Vol. 17, 12. — P. 853–867.

Saghatelian A., De Chevigny A., Schachner M., et al. Tenascin-R mediates activity dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain // *Nat. Neurosci.* — 2004. — Vol. 7. — P. 347–356.

Saltiel A.R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes // *Cell*. — 2001. — Vol. 104. — P. 517–529.

Schwartz P.H., Bryant P.J., Fuja T.J., et al. Isolation and characterization of neural progenitor cells from postmortem human cortex // *J. Neurosci. Res.* — 2003. — Vol. 74. — P. 838–851.

Shen Q., Qian X., Capela A., Temple S. Stem cells in the embryonic cerebral cortex: their role in histogenesis and patterning // *J. Neurobiol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 162–174.

Shihabuddin L.S., Palmer T.D., Gage F.H. The search for neural progenitor cells: prospects for the therapy of neurodegenerative disease // *Mol. Med. Today*. — 1999. — Vol. 5. — P. 474–480.

Shihabuddin L.S., Ray J., Gage F.H. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord // *Exp. Neurol.* — 1997. — Vol. 148. — P. 577–586.

Storch A., Schwarz J. Neural stem cells and neurodegeneration // *Curr. Opin. Invest. Drugs*. — 2002. — Vol. 3. — P. 774–781.

Sugaya K., Brannen C.L. Stem cell strategies for neuroreplacement therapy in Alzheimer's disease // *Med. Hypotheses*. — 2001. — Vol. 57. — P. 697–700.

Suhonen J.O., Peterson D.A., Ray J., et al. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo // *Nature*. — 1996. — Vol. 383. — P. 624–627.

Takahashi M., Arai Y., Kurosawa H., et al. Ependymal cell reactions in spinal cord segments after compression injury in adult rat // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* — 2003. — Vol. 62, 2. — P. 185–194.

Tanigaki K., Nogaki F., Takahashi J., et al. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate // *Neuron*. — 2001. — Vol. 29. — P. 45–55.

Van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus // *Nature*. — 2002. — Vol. 415, 6875. — P. 1030–1034.

Warfvinge K., Kamme C., Englund U., et al. Retinal integration of grafts of brain-derived precursor cell lines implanted subretinally into adult, normal rats // *Exp. Neurol.* — 2001. — Vol. 169. — P. 1–12.

Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A., et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells // *Nat. Neurosci.* — 2005. — Vol. 8. — P. 288–296.

Wehner T., Bontert M., Eyupoglu I., et al. Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo // *J. Neurosci.* — 2003. — Vol. 23, 12. — P. 5004–5011.

Weiss S., Dunne C., Hewson J., et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis // *J. Neurosci.* — 1996. — Vol. 16. — P. 7599–7609.

Wernig M., Benninger F., Schmandt T., et al. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo // *J. Neurosci.* — 2004. — Vol. 24. — P. 5258–5268.

White P.M., Morrison S.J., Orimoto K., et al. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals // *Neuron*. — 2001. — Vol. 29. — P. 57–71.

Wolpert L. Positional information and pattern formation in development. // *Dev. Genet.* — 1994. — Vol. 15. — P. 485–490.

Young M.J., Ray J., Whiteley S.J., et al. Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats // *Mol. Cell. Neurosci.* — 2000. — Vol. 16. — P. 197–205.

Yusta-Boyo M.J., Gonzalez M.A., Pavon N., et al. Absence of hematopoiesis from transplanted olfactory bulb neural stem cells // *Eur. J. Neurosci.* — 2004. — Vol. 19, 3. — P. 505–512.

Zhang X., Klueber K.M., Guo Z., et al. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium // *Exp. Neurol.* — 2004. — Vol. 186, 2. — P. 112–123.

Zhao M., Momba S., Delfani K., et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 7925–7930.

Zheng W., Nowakowski R.S., Vaccarino F.M. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone // *Dev. Neurosci.* — 2004. — Vol. 26. — P. 181–196.

ГЛАВА 11. СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ ОРГАНОВ ЗРЕНИЯ И СЛУХА

11.1. Стволовые клетки глаза

11.1.1. Формирование тканей глазного пузыря

У эмбрионов позвоночных после первичного выпячивания глазного пузыря быстро образуются несколько типов эпителиальных тканей, значительно отличающихся между собой: сетчатка, пигментированный эпителий, радужная оболочка, ресничный эпителий ресничного тела и ножка глазного пузыря (рис. 11.1). С начала прошлого столетия известно, что решающее значение для развития глазного пузыря имеют окружающие его ткани. В последнее время с применением маркеров различных доменов глазного пузыря получены некоторые данные о природе индуктивных сигналов, регулирующих формирование его тканей [обзор 522]. В развитии пигментированного эпителия у разных видов животных первостепенное участие принимает мезенхима головы, генетическое семейство TGF- β и активин — белок, подобный костным морфогенетическим белкам (BMP). Резко повышенная экспрессия ноггина, ингибитора BMP, приводит к замещению вентрального пигментированного эпителия тканью, подобной нейроэпителию. В развитии пигментированного эпителия участвуют также члены семейства Hedgehog и сигнальная молекула Gas 1 (growth arrest specific) — фактор специфической задержки роста. Развитию нейральной сетчатки благоприятствует активное сигнальное взаимодействие между эктодермой и глазным пузырем. При трансплантации глазного пузыря в эктопические места эмбриона вместо нейральной сетчатки может развиваться слой пигментированного эпителия. Среди молекулярных индукторов нейральной сетчатки находится, вероятно, один или несколько пептидов семейства FGF. Ресничный эпителий и радужка развиваются из ободка глазного кубка, находящегося в тесной связи с хрусталиком. В формировании ресничного эпителия активную роль принимают BMP и сигнальная система Wnt, в частности, ген *Wnt 13/2b* [522].

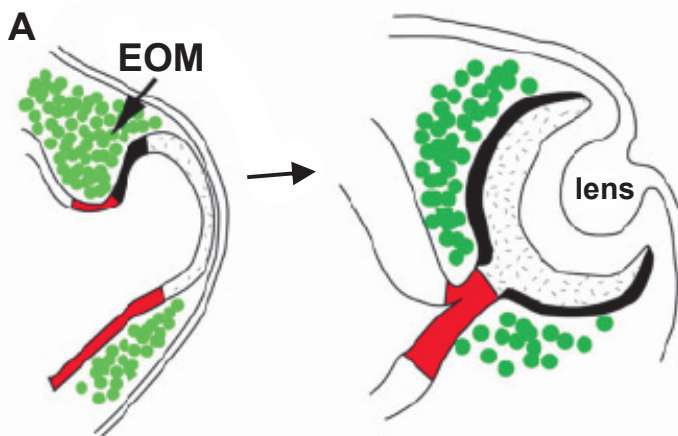


Рис. 11.1. Развитие глазного кубка из глазного пузыря

(А) Для развития глаза необходимо взаимодействие производных роstralной нейроэктодермы с окружающими мезенхимальными клетками (ЕОМ, экстраокулярная мезенхима), способствующее развитию пигментированного эпителия (черные полудужки). В то же время эктодерма, покрывающая хрусталик, способствует образованию нейральной сетчатки (мелкие крапинки). Для развития оптической ножки необходимы сигналы Shh (см. главу 4) из средней части промежуточного мозга. По работе Moshiri, et al. [522].

11.1.2. Стволовые клетки сетчатки

В сетчатке млекопитающих, также как в сетчатке низших животных и птиц, различают участки центрального и периферического роста и нейрогенеза. Митотически активные клетки-предшественники в последний раз обнаруживаются по краю сетчатки. У нормальных

мышей, в отличие от рыб и амфибий, гистогенез сетчатки завершается на первой постнатальной неделе и позже по краю сетчатки клетки в S фазе клеточного цикла не выявляются. При изучении сетчатки взрослого человека в некоторых клетках по месту соединения нейральной сетчатки и ресничного тела обнаруживается экспрессия нестина — маркера нервных клеток-предшественников. На основании этого предполагают, что у человека остаток ресничной краевой зоны сохраняется [Mayer, et al., 2003]. У мышей клетки, выделенные из ресничного эпителия или края сетчатки, при культивировании *in vitro* образуют «нейросферы» [Ahmad, et al., 2000; 752]. Эти клетки, первоначально содержащие пигмент, получили название «ретинальные СК». Предполагают, что они происходят из радужной оболочки или пигментированного ресничного эпителия.

Несмотря на отсутствие в сетчатке млекопитающих ресничной маргинальной зоны, этот регион глаза содержит потенциал для нейрогенеза. При исследовании мышей с мутациями генов сигнальных путей установлено, что у этих животных при наличии единичного аллеля гена корцепторов Sonic Hedgehog (Shh) краевая зона сетчатки содержит небольшое число пролиферирующих клеток. После введения животным BrdU по краю сетчатки было обнаружено много меченых клеток, проявляющих наличие маркеров клеток-предшественников сетчатки, таких как Chx10, Pax6 и нестин. Эти меченые клетки обладали способностью внедряться в сетчатку и экспрессировали антигены ретинальных нейронов. Предполагают, что краевая зона сетчатки млекопитающих имеет большое значение не только во время нормального развития глаза, но и способна регенерировать сетчатку после ее повреждения [522].

У человека мультипотентные СК, способные вызвать образование всех дифференцированных клеток сетчатки глаза, также обнаруживаются среди пигментцитов ресничного тела, в участке так называемого ресничного края (ciliary margin) [751; Coles, et al., 2004]. В процессе дифференцировки *in vitro* ретинальных СК образуются специфические для структуры сетчатки типы клеток: фоторецепторные и биполярные нейроны, глиocyты сетчатки (мюллеровские клетки) и др. Количество ретинальных СК в ткани одного глаза ребенка, возраст которого не превышает 70 дней, менее 10000 [Coles, et al., 2004]. Предполагают, что ретинальные СК образуются во время нейроэмбриогенеза из клеточных элементов нервной ткани при непосредственном участии гена *Chx10* [751]. У ретинальных СК выявляют экспрессию рецепторов глутамата и GAMK [Sun, et al., 2002], а также рецепторов c-kit, участвующих в поддержании активного статуса ретинальных СК и взаимодействии с элементами сигнального каскада рецепторов Notch1 [Das, et al., 2004]. Основным фактором транскрипции в процессе дифференцировки производных ретинальных СК в ганглионарные клетки сетчатки глаза является фактор, соответствующий гену *Math5*. Этот же ген регулирует экспрессию ганглионарными клетками других факторов транскрипции: Brn3b, Cfil, IslII, NscII, Isl2 NscI2 и RPF-1 [820]. По мнению некоторых авторов, в дифференцировке ганглиарных клеток и клеток внутреннего ядерного слоя сетчатки принимают участие гены типа *Dlx*, *Pax*, *Chx* и др. [De Melo, et al., 2003]. Белок Wnt2b также, вероятно, участвует в поддержании активного статуса ретинальных СК ресничного края и подавляет их дифференцировку [Kubo, et al., 2003]. Векторное введение в изолированные клетки ресничного тела и радужной оболочки зрелой крысы активного гомеобоксного гена *Otx2* или *Crx* способствовало индукции экспрессии родопсина и вызывало появление у клеток фенотипа фоторецепторных нейронов сетчатки глаза [Akagi, et al., 2004]. Пронейрональная дифференцировка ретинальных СК способствуют также bFGF и TGF- α [Ezeonu, et al., 2003].

11.1.3. Стволовые клетки пигментного слоя сетчатки

У амфибий, тритонов, аксолотлей и головастиков лягушки после удаления сетчатки без повреждения пигментированного эпителия вначале отмечают исчезновение пигмента у последнего, а затем обнаруживают пролиферацию клеток с образованием двух новых слоев эпителия: пигментированного и непигментированного. В клетках пигментированного слоя

выявляют экспрессию генов, типичных для прогениторных клеток сетчатки; эти клетки интенсивно пролиферируют, полностью восстанавливая сетчатку. Таким образом, процесс регенерации сетчатки у низших животных проходит в два этапа. На первом этапе происходит дедифференцировка пигментированного эпителия в клетки-предшественники, а на втором — эти прогениторные клетки пролиферируют и дифференцируются в разнообразные клетки сетчатки. После трансплантации пигментированного эпителия сетчатки одного животного в заднюю камеру глаза другого животного в течение нескольких недель наблюдается трансформация пигментированного эпителия в многослойную нейральную сетчатку [обзор Reh, Levine, 1998]. Опыты *in vitro* также подтвердили, что пигментированный эпителий является источником нейральной ткани сетчатки. Регенерацию сетчатки из пигментированного эпителия можно рассматривать как одно из первых проявлений «трансдифференцировки» [Okada, 1981]. Подобный же феномен трансдифференцировки можно наблюдать в глазу эмбриона кур [Coulombre, Coulombre, 1965]. Сетчатка, образующаяся после такой трансдифференцировки, расслаивается подобно контрольной сетчатке и содержит нормальное соотношение разных типов клеток. Было замечено, что для трансдифференцировки пигментированного эпителия эмбриона кур необходимо оставлять в глазу небольшой кусочек нейральной ткани сетчатки. Позже было установлено, что этот кусочек нейральной сетчатки может быть заменен ростовыми факторами из семейства FGF (FGF1, FGF-2 или FGF-8) [Park, Hollenberg, 1991]. Напротив, активин блокирует регенерацию сетчатки из пигментированного эпителия, даже в присутствии FGF [522].

У человека клетки пигментного слоя сетчатки развиваются из наружного слоя глазного бокала, т. е. являются производными роstralной нейроэктодермы (рис. 11.1). Среди этих клеток также обнаруживают делящиеся клетки-предшественники нейронального типа [Amemiya, et al., 2004]. При сравнении митотического потенциала и дифференцировки нейрогенных прогениторов у молодых и пожилых лиц установлено, что пигментциты сетчатки пожилых людей дают рост много меньшему количеству зрелых нейронов, чем пигментциты, выделенные из сетчатки молодых лиц. При культивировании прогениторных клеток обеих групп в них обнаруживалась экспрессия тубулина- β III и более позднего нейронального маркера MAP5. Под влиянием ретиноевой кислоты клетки начинали экспрессировать белок NF 200 (нейроволокон, 200kDa). Однако авторам не удалось доказать наличие мультипотентности у клеток, выделенных из пигментного слоя сетчатки, а также способность их к самообновлению. В то же время авторы монографии [37] не отрицают содержания НСК среди пигментцитов сетчатки. Александрова М. А. и др. [1] в сферах, выращенных из сетчатки плодов человека, обнаружили стволовые/прогениторные клетки, нейробласты и фоторецепторы. Авторы заключили, что в сферах длительно сохраняются жизнеспособные специфические комплексы прогениторных клеток с уникальными контактами и микросредой, которые необходимы для поддержания длительной пролиферации и нормальной дифференцировки клеток сетчатки.

Одной из наиболее примечательных особенностей регенерации сетчатки является вариабельность клеточных источников и механизмов, которые могут участвовать в этом процессе. Предполагают, что нейрогенный потенциал пигментированного и ресничного эпителия и глии Мюллера находится под активной и в некоторых случаях обратимой репрессией [522].

11.1.4. Стволовые клетки роговицы, склеры и сосудистой оболочки

Четкость зрения обеспечивается гладкой поверхностью глаза, на которой обмен эпителиальных клеток роговицы происходит каждые 3–10 дней. Этот динамический гомеостаз в роговице имеет уникальную особенность: он поддерживается в условиях непрерывной центростремительной миграции эпителиальных клеток к центру роговицы и кольцевой миграции их из края лимба — узкой переходной зоны между прозрачной роговицей и непрозрачной склерой. Сложную многослойную структуру роговицы, обеспечивающую защиту

глаза, преломление лучей и прозрачность видения, образуют СК роговицы, локализованные, очевидно, в лимбе. Точная идентификация, выделение и получение характеристики СК роговицы пока невозможны из-за отсутствия специфических маркеров, но косвенные доказательства, подтверждающие наличие эпителиальных СК роговицы в лимбальном регионе, имеются. В частности, установлено, что среди базальных клеток лимба содержатся клетки с замедленным клеточным циклом, долго сохраняющие внесенную метку (третий тимидин или бромдезоксимуридин) [Morris, Potten, 1994]. Клетки лимба обладают *in vitro* также более высоким потенциалом деления, чем эпителиальные клетки из центральной части роговицы. Идеальными нишами СК в лимбе могут быть палисады Вогта [Townsend, 1991] — сложные колоночные структуры, выявляемые в лимбе. Они имеют обильную сосудистую сеть и высокую иннервацию. Предполагают, что палисады Вогта обеспечивают СК уникальное защитное микроокружение, отвечающее всем требованиям идеальной ниши [Charukamnoetkanok, 2006].

Обычно роговица не содержит сосудов, но травматическое воздействие может вызывать неоваскуляризацию роговицы, т. е. вторжение капилляров из плексуса лимба [724; Chang, et al., 2001]. Описаны три главных типа неоваскуляризации роговицы: поверхностная, фибрознососудистая и глубокая стромальная. Последние два типа могут привести к значительной потере зрения, если очаг поражения захватывает зрительную ось. Во всем мире ежегодно более 7 миллионов человек теряют свое зрение, вследствие помутнения роговицы и ее васкуляризации [Lee, et al., 1998]. Одной из причин васкулогенеза в роговице является повреждение или недостаток лимбальных СК [Charukamnoetkanok, 2006]. Этиологическими факторами могут быть травма, химические поражения, ношение контактных линз, воспаление (синдром Стивенса-Джонсона, глазной рубцовый пемфигус, инфекция роговицы) и врожденная аниридия. В качестве диагностического признака недостаточности СК лимба предлагают использовать «конъюнктивализацию» роговицы. Неспособность эпителия должным образом покрыть заново роговицу запускает порочный цикл, приводящий к рубцеванию роговицы и ее сосудистой инвазии. У больных с конъюнктивализацией роговицы можно провести реконструкцию глаза с сохранением зрения путем пополнения эпителиальных СК роговицы и замещения поврежденной роговицы прозрачным «окном», клетки которого активно разрастаются в неблагоприятном окружении [Kenyon, Tseng, 1989; Charukamnoetkanok, 2006]. Однако при заготовке аутологичного трансплантата ткани роговицы «вслепую» хирург может столкнуться с двойным риском. Один — когда аутооттрансплантат лимба не будет содержать достаточного числа СК (тогда операция сразу может быть неудачной или благоприятный эффект будет непродолжительным), и другой — когда при взятии аутооттрансплантата удаляется слишком много СК (тогда у больного в новом месте возникают проблемы, связанные с недостатком лимбальных СК) [Holland, Schwartz, 2000]. При двухстороннем поражении глаз у больного источником СК для него может быть только ткань аллогенного донора [Holland, Schwartz, 2000; Djalilian, et al., 2003], применение которой, несмотря на терапию иммунодепрессантами, не дает продолжительного эффекта [Tsubota, et al., 1999]. Для пополнения количества СК лимба за счет аллогенных трансплантатов было предложено несколько подходов, таких как заключение их в амниотическую оболочку или предварительное культивирование *ex vivo* [Pellegrini, et al., 1997; Tsai, et al., 2000]. Однако добиться существенного продления функционирования трансплантата не удалось. Причинами низкой эффективности таких подходов может быть недостаточное содержание региональных СК внутри трансплантата, повреждение или гибель СК при помещении их на воспаленную глазную поверхность или быстрое истощение СК при неблагоприятном микроокружении. Предотвращение таких исходов невозможно из-за неспособности точно идентифицировать СК. В результате, хирурги часто вынуждены отказываться от операции по восстановлению зрения у больных, которым могла бы помочь трансплантация СК лимба.

11.1.5. От экспериментальной трансплантации сетчатки к трансплантации стволовых клеток

Еще в 1982 г. McLoon с сотрудниками показали, что сетчатка плодов, трансплантированная в мозг новорожденных крысят, подвергается дифференцировке и образует связи с окружающими тканями [McLoon, et al., 1982]. На этой же модели было установлено, что трансплантация сетчатки может вызвать зрачковый рефлекс даже у зрелых крыс, и постоянство этой реакции отражает наличие лежащих в основе отношений трансплантат — хозяин [Klassen, Lund, 1987]. Опыт внутричерепной трансплантации был дополнен работами по ортотопической трансплантации сетчатки и пигментированного эпителия сетчатки, которые показали выживание и дифференцировку этих трансплантатов в сетчатке, субретинальном пространстве и стекловидном теле [Little, et al., 1998]. В отличие от опытов с внутричерепной трансплантацией помещение плотной ткани сетчатки в глаз оказалось более проблематичной в плане функционального объединения с тканями зрелого хозяина. Решение этой ключевой проблемы ортотопической интеграции стало возможным с применением трансплантации прогениторных/стволовых клеток.

После введения клеток-предшественников гиппокампа взрослых крыс в стекловидное тело крыс с активной дегенерацией сетчатки выявляли нейрональную дифференцировку донорских клеток и морфологическую интеграцию их с клетками хозяина [Young, et al., 2000]. Эти данные подтверждают наличие у НСК взрослых потенциала для дифференцировки в нейральные клеточные типы внутри поврежденной зрелой нервной системы. Как *in vitro*, так и после трансплантации отмечали предпочтительную дифференцировку НСК в астроциты, тогда как нейронов образовывалось мало. Однако было предложено несколько приемов, способных стимулировать нейрональную дифференцировку во время развития и повышающих возможность влиять на нейрогенез из НСК. Например, после обработки СК перед имплантацией *нейрогенином 2* — геном, способствующим дифференцировке в нейроны, — наблюдали повышение образования клеток-предшественников из краниального сенсорного ганглия [Fode, et al., 1998; Ma, et al., 1999]. После трансдукции НСК *нейрогенином 2 in vitro* выявляли дифференцировку 95 % этих клеток в нейроны [Falk, et al., 2002]. Однако полного приживления и дифференцировки СК и прогениторных клеток, выделенных из мозга, в микроокружении зрелой пораженной сетчатки пока достичь не удавалось [Klassen, et al., 2004]. Больших успехов можно, вероятно, добиться при применении клеток-предшественников, выделенных из нейральной сетчатки развивающихся глаз млекопитающих [Shatos, et al., 2001]. Предполагают, что эти клетки после трансплантации в сетчатку взрослого могут создать новую функциональную сеть сосудов, улучшить сигнальную систему хозяина и дифференцироваться во все нейроны сетчатки, включая фоторецепторы.

Исследования последних лет предполагают высокую степень пластичности лимбальных, роговичных и ретинальных СК взрослого человека. В течение свыше 14 месяцев после трансплантации подобных СК больным с их недостатком отмечали положительный клинический эффект у 70 % больных и улучшение зрения у более чем 40 % больных [Daya, et al., 2005]. Предполагают, что регенерация обусловлена либо самими донорскими СК, либо мобилизацией ими СК хозяина. Изменяя трофическое микроокружение сетчатки, роговицы, склеры или сосудистой оболочки, СК вызывают регенерацию частей глаза даже в условиях тяжелой хронической дегенерации. В то же время в экспериментах на животных показано, что при трансплантации СК сетчатки глаза в дегенеративное окружение эти клетки погибают. Таким образом, умелая манипуляция с факторами роста и дифференцировки может обеспечить выживание СК глаза и их дифференцировку в нужном направлении. Другая возможность повышения выживаемости трансплантированных СК может быть связана с типом примененных СК. У мышей с пигментозным ретинитом наблюдали дифференцировку Lin[−] ГСК по крайней мере в 6 типов клеток, включая эндотелий сосудов. После введения Lin[−] ГСК человека или мыши в полость стекловидного тела иммунодефицитных мышей выявляли не только пре-

крашение разрушения сосудов сетчатки, но также образование нейротрофических зон роста. К сожалению, пока не идентифицированы ранние маркеры СК сетчатки. Поэтому очень сложно выделить клетки-предшественники из огромного числа клеток других типов, образующихся в процессе дифференцировки.

11.2. Органы чувств: ухо

11.2.1. Волосковые клетки сенсорного эпителия внутреннего уха как мишень патологического и терапевтического воздействия

Нарушение слуха — распространенное заболевание, наиболее частой причиной которого является дегенерация сенсорного эпителия (кортиева орган) в слуховой части внутреннего уха. Сенсорный эпителий внутреннего уха состоит из двух различных типов клеток: чувствительных волосковых клеток (таких клеток менее 15000 во внутреннем ухе), являющихся механорецепторами, определяющими звуковые сигналы и нарушение равновесия, и нечувствительных поддерживающих клеток. Потеря волосковых клеток при старении, при действии стрессовых факторов окружающей среды и некоторых химиотерапевтических препаратов, например, аминогликозидных антибиотиков, вызывает повреждение слуха, вплоть до полной глухоты. Высока также частота наследственной потери слуха: один ребенок из каждой тысячи рождается глухим; еще один из того же числа становится глухим до совершеннолетия. Каждый третий взрослый в возрасте свыше 65 лет имеет нарушение слуха, в связи с чем это состояние является одним из самых распространенных хронических заболеваний [Li, et al., 2004].

В настоящее время некоторые исследователи склонны считать, что после повреждения сенсорного эпителия волосковые клетки способны восстанавливаться [Sobkowicz, et al., 1997; Zheng, et al., 1999; Gale, et al., 2002]. Однако если повреждение было тяжелое, происходит гибель всех волосковых клеток, и они либо вытесняются из эпителия, либо поглощаются соседними клетками. После гибели волосковых клеток их синаптические окончания оттягиваются нейронами VIII пары черепномозговых нервов.

У птиц и низших позвоночных сигналы от поврежденных волосковых клеток запускают пролиферацию поддерживающих клеток и трансдифференцировку их в незрелые волосковые клетки, которые под влиянием молекулярных или генетических факторов окружения могут дифференцироваться в функционирующие волосковые клетки [Corwin, Cotanche, 1988; Stone, et al., 1999; Woolley, et al., 2001]. В конечном итоге нервные волокна VIII-й пары черепномозговых нервов вновь связывают новообразованные волосковые клетки с ЦНС, чтобы животное могло получать сенсорную информацию [Smolders, 1999].

У взрослых млекопитающих может происходить только незначительное восстановление популяции клеток вестибулярного аппарата [Warchol, et al., 1993; Rubel, et al., 1995; Li, Forge, 1997; Staecker, VanDe Water, 1998], тогда как данные о регенеративной способности волосковых клеток слуховой части внутреннего уха после повреждения практически отсутствуют [Matsui, et al., 2005]. Более того, в слуховой системе, как и в других афферентных системах, дегенерация нейронов спирального ганглия и слухового нерва часто развиваются вторично после потери сенсорного эпителия улитки, отягощая, таким образом, функциональное повреждение и снижая возможность реабилитации [Nadol, et al., 1989; Ryals, et al., 1989; Hardie, et al., 1999; Marzella, Clark, 1999].

Вместе с тем, во время эмбрионального развития млекопитающих выявлены периоды, когда в незрелой улитке могут быть индуцированы дополнительные волосковые клетки. В частности, у мышей такие клетки образовывались между E13 и E16 днями после обработки недифференцированных прогениторных клеток ретиновой кислотой [Kelley, et al., 1995]. Если во время этого периода имеющиеся волосковые клетки необратимо повреждались лазером, соседние некоммитированные прогениторные клетки изменяли свою судьбу и дифференцировались в волосковые клетки, заменяя погибшие. На основании опытов с маркерами синтеза ДНК установлено, что дополнительные или заместительные волосковые клетки не развива-

ются за счет пролиферации уже имеющихся волосковых клеток, а происходят только из СК. После эмбриогенеза пролиферативная и регенеративная активность в улитке млекопитающих прекращается, что, вероятно, необходимо для создания более стабильного и сложного слухового процессора [Matsui, et al., 2005].

В связи с тем, что млекопитающие, в отличие от птиц и низших позвоночных, неспособны регенерировать волосковые сенсорные клетки внутреннего уха, разрабатываются экспериментальные подходы для регенерации или замены потерянных слуховых клеток. Образование новых сенсорных клеток или нейронов может быть достигнуто в результате активации стволовых/прогениторных клеток улитки или путем конверсии поддерживающих клеток [Lowenheim, et al., 1999; Zheng, Gao, 2000; Raphael, 2002; Kawamoto, et al., 2003]. Но в случаях, когда волосковые клетки и нейроны спирального ганглия тяжело повреждены или отсутствуют, в качестве наиболее привлекательной альтернативы рассматривается клеточная заместительная терапия. При этом следует рассчитывать, что трансплантированные СК не только смогут заменить отсутствующие клетки улитки, но также полностью включатся в слуховую систему как структурно, так и функционально.

11.2.2. Перспективы образования клеток внутреннего уха из экзогенных стволовых клеток

В качестве возможных источников СК млекопитающих, способных регенерировать волосковые клетки внутреннего уха, рассматриваются ЭСК, региональные СК из различных органов и тканей и собственные СК внутреннего уха [Li, et al., 2004]. Субпопуляция прогениторных клеток, происходящая из ЭСК мышей, после дифференцировки *in vitro* проявляла фенотип волосковых клеток, характеризующийся экспрессией таких характерных маркеров, как факторы транскрипции Math 1 и Brn 3.1, которые важны для образования и поддержания зрелости волосковых клеток (рис. 11.2) [Bermingham, et al., 1999; Xiang, et al., 1997]. Экспрессия этих регуляторов транскрипции сопровождалась повышением содержания структурных белков волосковых клеток, таких как нетрадиционный миозин VIIA, парвальбумин 3 и эспин [Li, et al., 2003, 2004]. Прогениторные клетки, происходящие из ЭСК, не попавшие после имплантации во внутреннее ухо реципиента (цыпленка) и осевшие в других местах, не экспрессировали маркеров волосковых клеток. В связи с этим можно предположить, что прогениторные клетки внутреннего уха, происходящие из ЭСК, реагируют на местные факторы, контролирующие спецификацию волосковых клеток в развивающемся внутреннем ухе цыпленка. Хотя сенсорный эпителий внутреннего уха птиц отличается от поврежденного или больного кортиева органа млекопитающих или их вестибулярного эпителия, содержащего волосковые клетки, эти результаты являются первым успешным примером образования *in vivo* волосковых клеток из ЭСК. Применяя условия, которые были разработаны для ЭСК мышей, будет, вероятно, возможно получить волосковые клетки из ЭСК человека.

Имеется несколько работ, в которых проводились манипуляции со СК с целью обнаружения в этих клетках признаков, характерных для предшественников волосковых или нейральных клеток. Повышенное образование новых волосковых клеток выявляли после введения в слуховой пузырь куриного эмбриона ЭСК мыши [Li, et al., 2003a]. Дифференцировку СК КМ мышей в нейроноподобные клетки наблюдали после обработки этих клеток ретиноевой кислотой и генами Sonic hedgehog [Kondo, et al., 2005]. Kanda и др. [Kanda, et al., 2004] индуцировали образование таких же клеток из ЭСК мышей, вызвав у них повышенную экспрессию bHLH. На основании опыта трансплантации эмбриональных клеток дорзального корня ганглия во внутреннее ухо взрослых грызунов авторы работы [Hu, et al., 2004] заключили, что нейроны в улитке выживают достаточно хорошо и, что особенно важно, мигрируют в спиральный регион ганглия и вдоль периферических отростков, проникающих в кортиев орган. Можно предположить, что применение НСК вместо ЭСК может повысить их дифференцировку в клетки функционального назначения для слуховой системы. Действительно, после введения

СК гиппокампа крысы в улитку новорожденных крысят было обнаружено включение этих клеток в эпителий улитки [Ito, et al., 2001]. Parker и др. [Parker, et al., 2005] после трансплантации в улитки нормальных или обработанных неомицином животных нейросферы взрослых морских свинок наблюдали более высокую степень выживания СК в улитках животных, обработанных неомицином. В опытах с трансплантацией в поврежденные улитки мышей и морских свинок НСК специфической линии эти клетки выживали до 6 недель, включаясь в местах поражения в спиральные ганглии и кортиев орган и дифференцируясь в нейроны, глию, волосковые и поддерживающие клетки [Parker, et al., 2005].

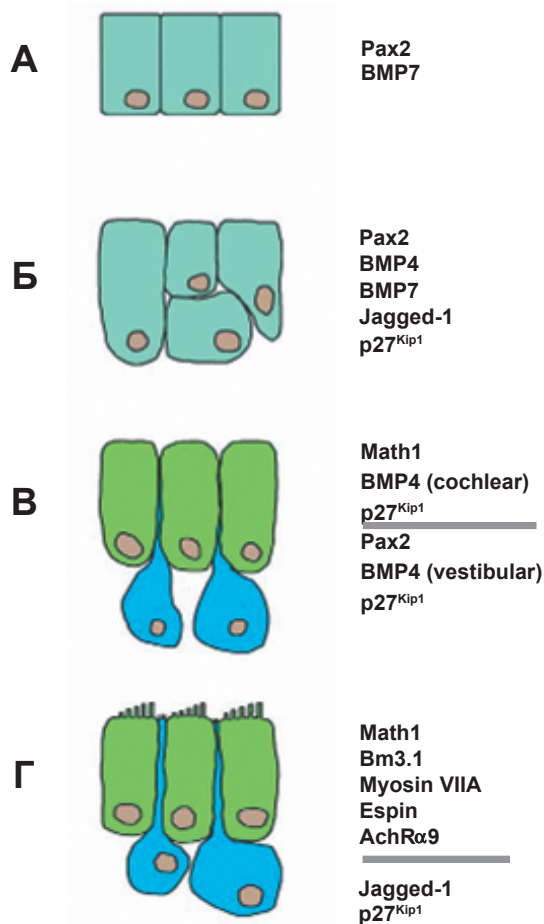


Рис. 11.2. Зарождение и развитие волосковых клеток из стволовых клеток

А — стадия слуховой плакоды;

Б — ранний сенсорный эпителий;

В — ранние дифференцирующиеся волосковые и поддерживающие клетки;

Г — созревающий сенсорный эпителий.

Справа показаны маркерные гены, экспрессирующиеся на разных этапах развития сенсорного эпителия. По Li, et al., 2003.

НСК, трансплантированные в поврежденное лекарственными препаратами внутреннее ухо мыши, сохраняли жизнеспособность в течение нескольких недель и экспрессировали, не находясь в улитке, маркеры клеток зрелых типов, включая глию, нейроны и волосковые клетки [Iguchi, et al., 2003; Tateya, et al., 2003]. При сравнении *in vitro* потенциалов НСК взрослых мышей и СК из внутреннего уха этих же животных были обнаружены два существенных раз-

личия в способности этих клеток дифференцироваться в клетки, обладающие маркерами волосковых клеток [Li, et al., 2003a]. Во-первых, НСК редко (менее 0,1 %) вызывали образование клеток с маркерами волосковых клеток, тогда как в клетках, дифференцированных из СК внутреннего уха, часто (до 10 % всех клеток) обнаруживались маркеры волосковых клеток. Во-вторых, СК внутреннего уха дифференцировались в волосковые клетки более полно, чем производные НСК.

Авторы работы [Hu, et al., 2005] трансплантировали НСК взрослых мышей во внутреннее ухо зрелых морских свинок для исследования выживаемости клеток в улитке и возможности замещения ими слуховых нейронов. У 50 % животных жизнеспособные НСК обнаруживались через 1–2 недели после трансплантации. Степень выживания была выше у животных, обработанных неомицином, повреждающим слух. У некоторых таких животных была выявлена экспрессия bIII-тубулина и GFAP. У 5 из 12 нормальных животных, которым трансплантировали НСК, трансдуцированные нейронспецифическими генами (*нейрогенином 2*), были обнаружены клетки, положительно окрашивающиеся на нейрональный маркер TUJ1. Авторы заключили, что клеточная терапия в сочетании с генной инженерией может обеспечить замену поврежденных или отсутствующих нейронов улитки и восстановить слуховую функцию у глухих.

В качестве еще одного клеточного препарата, способного обеспечить регенерацию волосковых клеток внутреннего уха, были изучены клетки костномозгового происхождения. Было отмечено, что введение клеток стромы КМ во внутреннее ухо шиншиллы вызывало повышение нейральных и глиальных маркеров [Naito, et al., 2004].

11.2.3. Стволовые клетки внутреннего уха

Популяция СК внутреннего уха была недавно выделена из перепончатого мешочка ушного лабиринта мышей [Li, et al., 2003a]. Эти клетки обладали способностью самообновляться и образовывали клетки с морфологией и биологическими маркерами волосковых клеток (миозин VIIa и Brn 3.1) и поддерживающих клеток (панцитокератин и p27^{Kip1}). После трансплантации куриному эмбриону эти клетки включались в мышцы и печень, что предполагает наличие у них мультипотентных свойств. Однако точное происхождение этих клеток не было установлено, так как они могли образоваться как из эпителия улитки, так и из мезенхимальных или сосудистых СК.

Приведенные данные показывают, что млекопитающие могут иметь, по крайней мере, в конечных вестибулярных органах, резидентную популяцию СК (рис. 11.2). Предполагаемые сенсорные пятна внутреннего уха экспрессируют определенную комбинацию маркеров, включающих сигнальные белки BMP4 и BMP7, лиганд Notch Jagged-1 и модулятор клеточного цикла p27^{Kip1} [Li, et al., 2004; Bryant, et al., 1997].

Дифференцировка волосковых клеток из СК внутреннего уха выявляется при существенном повышении маркерных генов волосковых клеток и появлении признаков цитоморфологической специфичности, в частности, выпячиваний богатых волокнистым актином, проявляющим иммунореактивность эспина — маркера волосковых клеток [Li, et al., 2003a; Malgrange, et al., 2002]. Введение мультипотентных СК в поврежденное ухо может привести к интеграции этих клеток в остаток сенсорного эпителия, получению необходимых сигналов для дифференцировки СК в волосковые и поддерживающие клетки и нейроны, которые могут репопулировать и восстанавливать поврежденный сенсорный эпителий (рис. 11.3). Для образования *in vitro* морфологически зрелых волосковых клеток необходим, вероятно, тесный контакт волосковых клеток с поддерживающими клетками. Способность СК внутреннего уха подвергаться митозу делает возможным разрастание этих клеток *in vitro* до их конечной дифференцировки в сенсорные эпителиальные клетки. Это может быть решением проблемы получения достаточного числа клеток для трансплантации и основанием для создания донорского банка клеток для подбора возможному реципиенту.

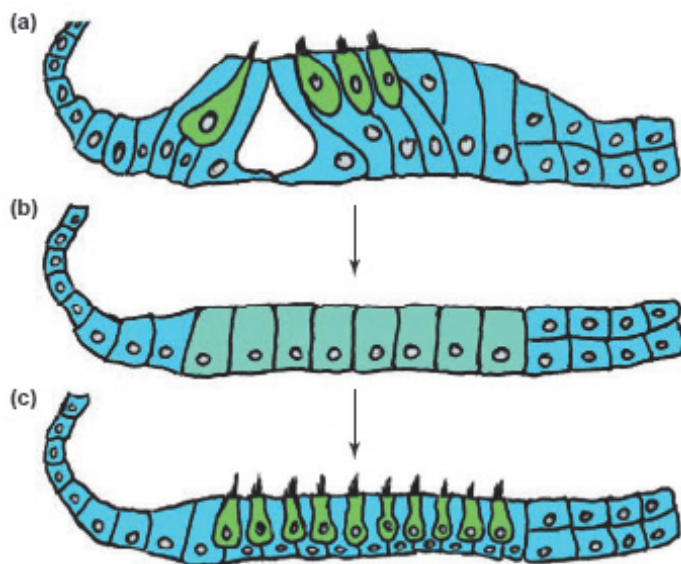


Рис. 11.3. Кортиев орган млекопитающих до и после потери слуховых клеток и предположительная регенерация волосковых клеток

(а) на поперечном срезе нормального кортиева органа обычно выявляется единичная внутренняя слуховая клетка и три наружных слуховых клетки. (б) После потери слуховой клетки кортиев орган подвергается морфологическому преобразованию. В некоторых случаях остающиеся клетки увеличиваются в размерах, чтобы скрыть эпителий; часто клетки теряют свои морфологические черты и принимают вид базального эпителия, как изображено здесь. (с) Предполагаемое образование регенерирующего сенсорного эпителия на месте дегенерированного кортиева органа. Новые волосковые клетки могут возникать вновь из прогениторных клеток или дифференцироваться при соответствующей стимуляции из клеток, которые остаются после потери волосковых клеток. По Li, et al., 2004.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Ahmad I., Tang L., Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye // Biochem. Biophys. Res. Commun. // 2000. — Vol. 270. — P. 517–521.

Akagi T., Mandai M., Ooto S., et al. Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2004. — Vol. 45, 12. — P. 4570–4575.

Amemiya K., Haruta M., Takahashi M., et al. Adult human retinal pigment epithelial cells capable of differentiating into neurons // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2004. — Vol. 316. — P. 1–5.

Bermingham, N.A. Hassan B.A., Price S.D., et al. Math1: An essential gene for the generation of inner ear hair cells // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 1837–1841.

Bryant J., Goodyear R.J., Richardson G.P. Sensory organ development in the inner ear: molecular and cellular mechanisms // Br. Med. Bull. — 2002. — Vol. 63. — P. 39–57.

Chang J.H., Gabison E.E., Kato T., et al. Corneal neovascularization // Curr. Opin. Ophthalmol. — 2001. — Vol. 12. — P. 242–249.

Charukamnoetkanok P. Corneal Stem Cells // Bridging the Knowledge Gap Seminars in Ophthalmology. — 2006. — Vol. 21. — P. 1–7.

Chen Z., De Paiva C.S., Luo L., et al. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia // Stem Cells. — 2004. — Vol. 22. — P. 355–66.

Coles B.L., Angenilux B., Inoue T., et al. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101, 44. — P. 15772–15777.

Corwin J.T., Cotanche D.A. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma // Science. — 1988. — Vol. 240. — P. 1772–1774.

Coulombre J.L., Coulombre A.J. Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo // *Dev. Biol.* — 1965. — Vol. 12. — P. 79–92.

Das A.V., James J., Zhao Y., et al. Identification of c-kit receptor as a regulator of adult neuralstem cells in the mammalian eye interactions with Notch signaling // *Dev. Biol.* — 2004. — Vol. 273. — P. 87–105.

Daya S.M., Watson A., Sharpe J.R., et al. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. // *Ophthalmology.* — 2005. — Vol. 112, 3. — P. 470–477.

DeMelo J., Qiu X., Du G., et al. Dix1, Dix2, Brnsb and Chx10 homeobox gene expression defines the retinal ganglion and inner nuclear layers of the developing and adult mouse retina // *J. Comp. Neurol.* — 2003. — Vol. 461, 2. — P. 187–204.

Djalilian A.R., Holland E.J., Schwartz G.S. Limbal stem cell deficiency // *Ophthalmology.* — 2003. — Vol. 110. — P. 2071–2072.

Engelhardt M., Wachs F.P., et al. The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro // *Exp. Eye Res.* — 2004. — Vol. 78, 5. — P. 1025–1036.

Ezeonu I., Wang M., et al. Density-dependent differentiation in nontransformed human retinal progenitor cells in response to basic FGF and TGF- α // *DNA Cell. Biol.* — 2003. — Vol. 22, 10. — P. 607–620.

Falk A., Holmström N., Carlen M., et al. Gene delivery to adult neural stem cells // *Exp. Cell Res.* — 2002. — Vol. 279. — P. 34–39.

Fode C., Gradwohl G., Morin X., et al. The bHLH protein neurogenin 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons // *Neuron.* — 1998. — Vol. 20. — P. 483–494.

Gale J.E., Meyers J.R., Periasamy A., et al. Survival of bundleless hair cells and subsequent bundle replacement in the bullfrog's saccule // *J. Neurobiol.* — 2002. — Vol. 50. — P. 81–92.

Hardie N.A., Shepherd R.K. Sensorineural hearing loss during development: morphological and physiological response of the cochlea and auditory brainstem // *Hear. Res.* — 1999. — Vol. 128. — P. 721–756.

Holland E.J., Schwartz G.S. Changing concepts in the management of severe ocular surface disease over twenty-five years // *Cornea.* — 2000. — Vol. 19. — P. 688–698.

Hu Z., Ulfendahl M., Olivius N.P. Survival of neuronal tissue following xenograft implantation into the adult rat inner ear // *Exp. Neurol.* — 2004. — Vol. 185. — P. 7–14.

Hu Z., Wei D., Johansson C.B., et al. Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear // *Exp. Cell Res.* — 2005. — Vol. 302. — P. 40–47.

Iguchi F.T., Nakagawa T.I., Tateya I., et al. Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation // *NeuroReport.* — 2003. — Vol. 14. — P. 77.

Ito J., Kojima K., Kawaguchi S. Survival of neural stem cells in the cochlea // *Acta Otolaryngol.* — 2001. — Vol. 121. — P. 140–142.

Kanda S., Tamada Y., Yoshidome A., et al. Over-expression of bHLH genes facilitate neural formation of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro // *Int. J. Dev. Neurosci.* — 2004. — Vol. 22. — P. 149–156.

Kawamoto K., Ishimoto S., Minoda R., et al. Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo // *J. Neurosci.* — 2003. — Vol. 23. — P. 4395–4400.

Kelley M.W., Talreja D.R., Corwin J.T. Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of Corti from embryonic and neonatal mice // *J. Neurosci.* — 1995. — Vol. 15. — P. 3013–3026.

Kenyon K.R., Tseng S.C. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders // *Ophthalmology.* — 1989. — Vol. 96. — P. 709–722.

Klassen H., Lund R.D. Retinal transplants can drive a pupillary reflex in host rat brains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1987. — Vol. 84, 19. — P. 6958–6960.

Klassen H., Sakaguchi D.S., Young M.J. Stem cells and retinal repair // *Progress in Retinal and Eye Res.* — 2004. — Vol. 23. — P. 149–181.

Kondo T., Johnson S.A., Yoder M.C., et al. Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fatespecification from bone marrow-derived pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102. — P. 4789–4794.

- Kubo F., Takeichi M., Nakagawa S. Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone // *Development*. — 2003. — Vol. 130, 3. — P. 587–598.
- Lee P., Wang C. C., Adamis A. P. Ocular neovascularization: an epidemiologic review // *Surv. Ophthalmol.* — 1998. — Vol. 43. — P. 245–269.
- Lowenheim H., Furness D. N., Kil J., et al. Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96. — P. 4084–4088.
- Li H., Liu H., Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 1293–1299.
- Li H., Roblin G., Liu H., Heller S. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 13495–13500.
- Li H., Corrales C. E., Edge A., et al. Stem cells as therapy for hearing loss // *TRENDS in Molecular Medicine*. — 2004. — Vol. 10, 7. — P. 309–315.
- Li L., Forge A. Morphological evidence for supporting cell to hair cell conversion in the mammalian utricular macula // *Int. J. Dev. Neurosci.* — 1997. — Vol. 15, 4–5. — P. 433–446.
- Little C. W., Cox C., Wyatt J., et al. Correlates of photoreceptor rescue by transplantation of human fetal RPE in the RCS rat // *Exp. Neurol.* — 1998. — Vol. 149, 1. — P. 151–160.
- Ma Q., Fode C., Guillemot F., et al. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia // *Genes Dev.* — 1999. — Vol. 13. — P. 1717–1728.
- Malgrange B., Belachew S., Thiry M., et al. Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture // *Mech. Dev.* — 2002. — Vol. 112. — P. 79–88.
- Marzella P. L., Clark G. M. Growth factors, auditory neurones and cochlear implants: a review // *Acta Oto-Laryngol.* — 1999. — Vol. 119. — P. 407–412.
- Matsui J. I., Parker M. A., Ryals B. M., et al. Regeneration and replacement in the vertebrate inner ear // *Drug discovery today*. — 2005. — Vol. 10, 19. — P. 1307–1312.
- Mayer E. J., Hughes E. H., Carter D. A., et al. Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes // *Br. J. Ophthalmol.* — 2003. — Vol. 87. — P. 1154–1158.
- McLoon L. K., Lund R. D., McLoon S. C. Transplantation of reagggregates of embryonic neural retinæ to neonatal rat brain: differentiation and formation of connections // *J. Comp. Neurol.* — 1982. — Vol. 205, 2. — P. 179–189.
- Morris R. J., Potten C. S. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro // *Cell Prolif.* — 1994. — Vol. 27. — P. 279–89.
- Nadol J. B., Young Y. S., Glynn R. J. Survival of spiral ganglion cells in profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* — 1989. — Vol. 98. — P. 411–416.
- Naito Y., Nakamura T., Nakagawa T., et al. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas // *Neuroreport*. — 2004. — Vol. 15. — P. 1–4.
- Okada T. S. Phenotypic expression of embryonic neural retinal cells in cell culture // *Vision Res.* — 1981. — Vol. 21. — P. 83–86.
- Park C. M., Hollenberg M. J. Induction of retinal regeneration in vivo by growth factors // *Dev. Biol.* — 1991. — Vol. 148. — P. 322–333.
- Parker M. A., Anderson J. K., Corliss D. A., et al. Expression profile of an operationally-defined neural stem cell clone // *Exp. Neurol.* — 2005. — Vol. 194. — P. 320–332.
- Pellegrini G., Traverso C. E., Franzi A. T., et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium // *Lancet*. — 1997. — Vol. 349. — P. 990–993.
- Raphael Y. Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration // *Br. Med. Bull.* — 2002. Vol. 63. — P. 25–38.
- Reh T. A., Levine E. M. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina // *J. Neurobiol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 206–220.
- Rubel, E. W., Dew L. A., Roberson D. W. Mammalian vestibular hair cell regeneration // *Science*. — 1995. — Vol. 267. — P. 701–707.

- Ryals B.M., Ten Eyck B., Westbrook E.W.* Ganglion cell loss continues during hair cell regeneration // *Hear. Res.* — 1989. — Vol. 43. — P. 81–90.
- Shatos M.A., Mizumoto K., Mizumoto H., et al.* Multipotent stem cells from the brain and retina of green mice e-biomed // *J. Regenerative Med.* — 2001. — Vol. 2. — P. 13–15.
- Smolders J.W.* Functional recovery in the avian ear after hair cell regeneration // *Audiol. Neurotol.* — 1999. — Vol. 4. — P. 286–302.
- Sobkowicz H.M., August B.K., Slapnick S.M.* Cellular interactions as a response to injury in the organ of Corti in culture // *Int. J. Dev. Neurosci.* — 1997. — Vol. 15. — P. 463–485.
- Staecker H., VanDe Water T.R.* Factors controlling hair-cell regeneration /repair in the inner ear // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 1998. — Vol. 8, 4. — P. 480–487.
- Stone J.S., Choi Y.S., Woolley S.M., et al.* Progenitor cell cycling during hair cell regeneration in the vestibular and auditory epithelia of the chick // *J. Neurocytol.* — 1999. — Vol. 28, 10–11. — P. 863–876.
- Sun W., Seigel G.M., Salvi R.J.* Retinal precursor cells express functional ionotropic glutamate and GABA receptors // *Neuroreport.* — 2002. — Vol. 13. — P. 2421–2424.
- Tateya I., Nakagawa T., Iguchi F., et al.* Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice // *Neuroreport.* — 2003. — Vol. 14. — P. 1677–1681.
- Townsend W.M.* The limbal palisades of Vogt // *Trans Am. Ophthalmol. Soc.* — 1991. — Vol. 89. — P. 721–756.
- Tsai R.J., Li L.M., Chen J.K.* Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — Vol. 343. — P. 86–93.
- Tsubota K., Satake Y., Kaido M., et al.* Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation // *N. Engl. J. Med.* — 1999. — Vol. 340. — P. 1697–1703.
- Warchol M.E., Lambert P.R., Goldstein B.J., et al.* Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans // *Science.* — 1993. — Vol. 259. — P. 1619–1622.
- Woolley S.M., Wissman A.M., Rubel E.W.* Hair cell regeneration and recovery of auditory thresholds following aminoglycoside ototoxicity in Bengalese finches // *Hear. Res.* — 2001. — Vol. 153. — P. 181–195.
- Xiang M., Gan L., Li D., et al.* Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94. — P. 9445–9450.
- Young M.J., Ray J., Whiteley S.J., et al.* Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats // *Mol. Cell. Neurosci.* — 2000. — Vol. 16. — P. 197–205.
- Zheng J.L., Keller G., Gao W.Q.* Immunocytochemical and morphological evidence for intracellular self-repair as an important contributor to mammalian hair cell recovery // *J. Neurosci.* — 1999. — Vol. 19. P. 2161–2170.
- Zheng J.L., Gao W.Q.* Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears // *Nat. Neurosci.* — 2000. — Vol. 3. — P. 580–586.

ГЛАВА 12. ЭПИДЕРМАЛЬНЫЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ

12.1. Локализация стволовых клеток эпидермиса

Кожа — первая линия защиты организма млекопитающих от обезвоживания, повреждений и заражений. Она состоит из дермального и эпидермального компонентов. Эпидермальный компонент или эпидермис (рис. 12.1) образует наружное покрытие кожи и включает многослойный эпителий, межфолликулярный эпидермис и придаточные структуры (волосные фолликулы, сальные и потовые железы). Слой клеток эпидермиса, непосредственно прилегающий к основной мембране, называется базальным слоем и отличается наличием пролиферирующих клеток, среди которых основное значение имеют эпителиальные клетки с сетью волокон кератина — кератиноциты. В эпидермисе человека различают две разновидности пролиферирующих кератиноцитов: СК, содержание которых может составлять до 10 % клеток базального слоя [598], и транзитные амплифицирующие клетки (ТАК), представляющие собой дочернее поколение СК, предназначенное для конечной дифференцировки, но еще способное совершить от двух до четырех циклов деления, перемещаясь из базального слоя к поверхности кожи. Во время перемещения к наружному слою ТАК созревают, их цитоплазма заполняется кератином, а мембраны становятся более жесткими в результате накопления белка инволюкрина. Конечная дифференцировка ТАК чаще всего завершается образованием безъядерных клеток (чешуек), наполненных нерастворимым белком кератином, обеспечивающим эффективную защиту подлежащим живым клеткам. Другими производными ТАК могут быть клетки придаточных структур, представляющие собой такие же кратковременно делящиеся клетки или клетки какой-либо одной линии. В последнем случае ТАК оказываются в роли «коммитированных клеток-предшественников», но тем не менее ограниченность потенциала дифференцировки ТАК не вызывает сомнений. В эпидермисе содержатся также мультипотентные СК, направление дифференцировки которых определяется микроокружением, в котором они оказываются [784].

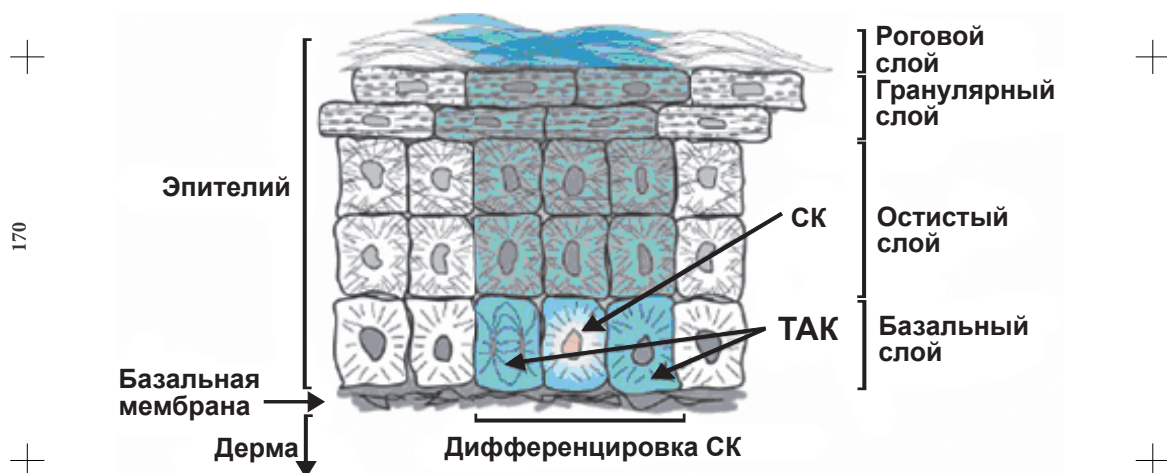


Рис. 12.1. Строение эпителия кожи

Медленно обновляющиеся СК локализованы в базальном слое кожи, который расположен над базальной мембраной. ТАК, образующиеся в результате деления СК, отделяются от базальной мембраны и выполняют программу конечной дифференцировки. При этом они теряют свой пролиферативный потенциал и мигрируют к поверхности кожи. В шиповатом или остистом слое эти клетки в процессе дифференцировки укрепляют цитоскелет и межклеточные связи, что повышает устойчивость кожи к механическим повреждениям. В зернистом слое, накапливая белки, богатые глутамином и лизином, они включаются в образование эпидермального барьера. Дифференцировка ТАК завершается в роговом слое образованием безъядерных клеток (чешуек), полностью наполненных нерастворимым белком кератином. По Alonso and Fuchs [56].

Популяция стволовых клеток дермы представлена мезенхимальными стволовыми (стромальными) клетками (МСК), которые характеризуются свойствами, присущими МСК КМ или жировой ткани: клоногенным ростом, образованием монослоя фибробластоподобных клеток с фенотипом CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD38⁻, способностью к мультилинейной дифференцировке при культивировании в средах, индуцирующих рост соответствующих клеток [Петренко А. Ю. и др., 2008].

В состав компонентов микроокружения, способных повлиять на выбранный СК путь дифференцировки, могут входить: белки экстраклеточного матрикса (ЭКМ); способные к диффузии факторы (гормоны и факторы роста, цитокины, морфогены); прямой контакт с соседними клетками; концентрация кислорода и питательных веществ и даже такой механический стимул, как силы натяжения [Niemann, Watt, 2002]. Подтверждение роли этих факторов было получено в работах по заживлению ран. Было обнаружено, что кератиноциты волосяных фолликулов могут мигрировать из фолликулов и репопулировать межфолликулярный эпидермис. Напротив, когда межфолликулярные кератиноциты трансплантировали в пустой волосяной фолликул, они дифференцировались по пути образования нормального волоса [Reynolds, Jahoda, 1992]. Имеются также данные, что клетки потовых желез могут образовать межфолликулярный эпидермис. Однако неизвестно, отражает ли это явление мультипотентную природу эпидермальных СК или процесс трансдифференцировки.

В коже мыши процесс дифференцировки от кератиноцитов базального слоя до чешуек занимает 10–14 дней. Оборот эпидермиса человека осуществляется медленнее. Очевидно, что пролиферативный резерв СК эпителия человека, который обеспечивает сохранение в течение всей жизни не менее 1–2 м² кожи, должен быть огромным. При культивировании *in vitro* на фидерном слое фибробластов в присутствии факторов роста показатель пролиферации кератиноцитов человека может быть представлен числом 10¹⁶ [56].

Изучение типов клонов, которые *in vitro* образуют пролиферирующие кератиноциты, позволило определить три разновидности этих клеток. Учредительный клон классифицируется как параклон, если он весь состоит из конечно дифференцированных клеток и вторичные клоны не возникают. Клон характеризуется как голоклон, когда конечно дифференцированными являются только 0–5 % клонов. Промежуточные клоны называются мероклонами. Таким образом, голоклоны имеют наивысший потенциал к самообновлению. Вероятнее всего их основателями являются истинные эпидермальные СК. Они способны к самообновлению в течение более 140 делений. Общая продолжительность жизни параклона до конечной дифференцировки не более 15 делений, и клетки их могут быть отнесены к ТАК. Клетки эпидермиса более пожилых лиц чаще относятся к мероклонам и не образуют или очень мало образуют голоклонов [Barrandon, Green, 1987]. К сожалению, часто для определения типа клона ограничиваются подсчетом клеток только в первичном клоне, что может привести к неправильному заключению (например, при определении в клоне через 14 дней после посева 32 клеток или меньше можно сделать заключение, что все клетки относятся к конечным ТАК) [365].

Гистологические исследования кожи млекопитающих не позволяют выявить специфическую нишу локализации эпидермальных СК в базальном слое. У мышей содержание СК среди клеток базального слоя определяли по способности этих клеток, меченных ретровирусом и экспрессирующих вследствие этого ген β-галактозидазы, реконструировать кожу *in vivo*. На основании определения размеров реконструированных в течение 12 недель колонок эпидермиса было заключено, что 10–12 % клеток базального слоя мыши являются СК [Mackenzie, 1997]. В базальном слое СК располагаются небольшими группами, окруженные активно делящимися ТАК.

Другой метод идентификации СК кожи заключается в использовании медленной цикличности этих клеток. После введения мышам аналогов нуклеотидов (BrdU или ³H-тимидина) метка включается в новообразованную клеточную ДНК. СК, характеризующиеся редким циклом деления, дольше сохраняют метку, что позволяет определить их локализацию. В 90-е годы прошлого столетия было установлено, что основная часть клеток кожи, сохраняющих

метку, находится в местах углублений волосяных фолликулов и лишь небольшая часть — в базальном слое межфолликулярного эпидермиса [Cotsarelis, et al., 1990]. Волосяные фолликулы (рис. 12.2) представляют собой эпидермальные отростки, состоящие из верхней неизменной части и нижней циклирующей части, в которой происходит образование волоса [56]. Клеточный состав волосяного фолликула — сложный и насчитывает восемь различных клеточных линий [Niemann, Watt, 2002]. Наружный футляр корня волоса биохимически подобен базальному слою эпидермиса, а внутренние слои волосяного фолликула состоят из трех concentрических слоев клеток внутреннего корня и трех concentрических слоев клеток, образующих волос [Cotsarelis, et al., 1990]. После посева в культуру иссеченных волосяных фолликулов крыс или человека наиболее высокая клоногенность была установлена у клеток из углублений волосяных фолликулов или ближайших к ним мест. Например, в скальпе человека наиболее высокая клоногенность была обнаружена у клеток, расположенных непосредственно под углублениями волосяных фолликулов. Пролиферативная способность этих клеток была огромной

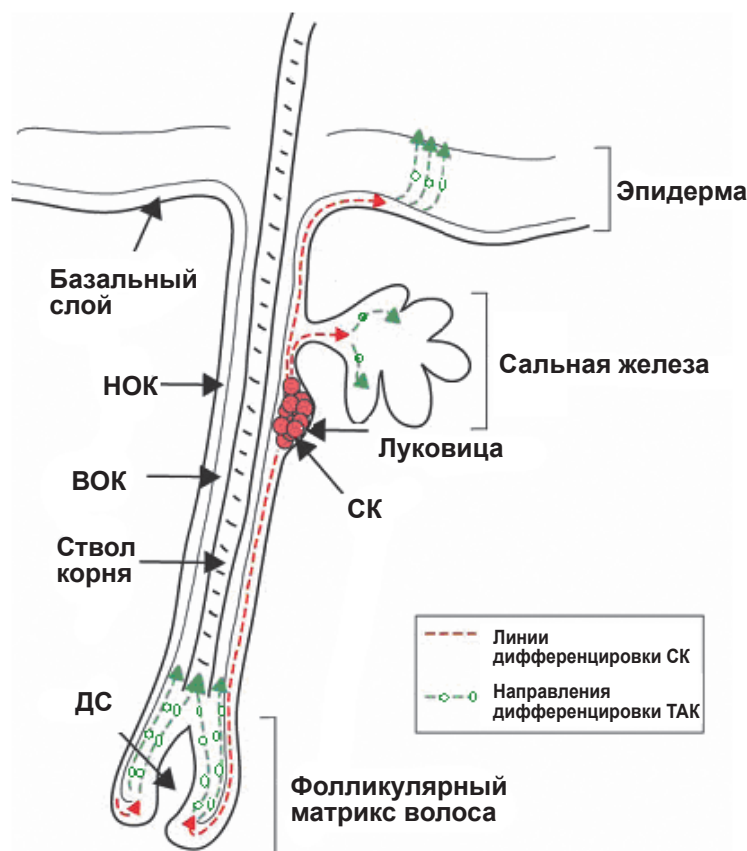


Рис. 12.2. Строение волосяного фолликула

Мультипотентные СК локализованы в луковице, которая располагается в наружной оболочке корня (НОК), чуть ниже сальной железы. НОК, вместе с базальным слоем эпидермиса, образует наружную оболочку волосяного фолликула. Внутренняя оболочка корня (ВОК) образует канал волоса; при приближении ствола волоса к поверхности кожи ВОК деградирует, освобождая волос. Ствол волоса и ВОК образуются из матрикса и ТАК волосяного фолликула. Фолликулярный матрикс окружает дермальный сосочек (ДС) — кластер специализированных мезенхимальных клеток. Предполагают, что мультипотентные СК, обнаруживаемые в луковице, образуют все клеточные линии волосяного фолликула, сальной железы и эпидермиса (см. штриховую линию). Потомство ТАК из СК луковицы дифференцируется в каждом из этих регионов так, как показано на рисунке (см. штрихпунктирную линию). По Alonso и Fuchs [56].

и характеризовалась теоретической возможностью образования $1,7 \times 10^{38}$ клеток из единичной СК [Rochat, et al., 1994]. Причем было отмечено, что СК из углублений волосяных фолликулов стимулируются к делению и образованию нового зародышевого матрикса волос только после получения сигнала из специализированных мезенхимальных клеток фолликулов [Cotsarelis, et al., 1990]. Поэтому делению клеток углублений предшествует возобновление роста волосяного фолликула [Wilson, et al., 1994].

Клетки волосяных фолликулов некоторые авторы рассматривают как клетки эмбрионального типа, сохраняющиеся у взрослых и легко изменяющие свою активность [421]. При трансплантации футлярных клеток фолликулярной дермы от одного лица другому они индуцировали рост фолликулов, не подвергаясь отторжению [Jahoda & Reynolds, 2001]. При экспериментальной ампутации оснований волосяных фолликулов оставшиеся клетки дермальных футляров (конечных луковичек) замещали главный индуктивный элемент дермы — дермальные сосочки, восстанавливали рост волос и активно образовывали клетки эритроидных и миелоидных линий, но не эпителиальные клетки фолликулов. При введении клеток сосочков и футляров дермы трансгенно маркированных мышей-доноров летально облученным реципиентам наблюдали мультилинейное восстановление кроветворных клеток, которое продолжалось не менее 13 месяцев. Свыше 70 % клоногенных клеток-предшественников происходили из клеток волосяных фолликулов доноров. Эти клетки сохраняли свой регенеративный потенциал при переносе вторичным реципиентам. Предполагают, что в коже волосяные фолликулы обеспечивают отдельную хорошо защищенную нишу, а фолликулярные клетки дермы являются главным источником СК эпидермиса при повреждении дермы [421].

12.2. Маркеры стволовых клеток эпидермиса

Первыми поверхностными маркерами эпидермальных СК человека были названы рецепторы $\beta 1$ интегринов, связывающие белки ЭКМ. $\beta 1$ интегрины экспрессируются всеми клетками базального слоя, но межфолликулярные кератиноциты со свойствами СК имеют в 2–3 раза более высокие уровни $\beta 1$ интегринов, чем клетки со свойствами ТАК. Именно на основании повышенного содержания $\beta 1$ интегринов приблизительно 10 % клеток базального слоя были отнесены к СК [598]. Содержание базальных клеток с высоким уровнем $\beta 1$ интегринов варьирует от 25 % в эпидермисе ладоней до более 40 % в клетках неонатальной крайней плоти. Повышенная экспрессия $\beta 1$ интегринов отмечается также у СК волосяных фолликулов [365].

Кератиноциты человека с наивысшей экспрессией $\alpha 2\beta 1$ интегринов (рецепторы коллагена) одновременно экспрессируют наивысшие уровни $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ интегринов (рецепторы ламинина и фибронектина, соответственно) [Watt, 2001]. Поэтому невозможно повысить содержание СК, применяя комбинацию антител, специфических для этих отдельных интегринов. Интегрины $\alpha 6\beta 4$ являются компонентами хемидесмосом и необходимы для закрепления эпидермиса на подлежащей базальной мембране. СК, подобно всем базальным кератиноцитам, экспрессируют $\alpha 6\beta 4$, но строгой корреляции между уровнем экспрессии этих интегринов и пролиферативным потенциалом не выявлено. Выявление других предполагаемых поверхностных маркеров СК эпидермиса было основано на взаимосвязи между пролиферативной активностью с экспрессией антигена, опознаваемым моноклональным антителом 10G7, а также слабо выраженной экспрессией Е-кадгерина и высокой экспрессией Delta1 [Lowell, et al., 2000]. Авторы работы [Watt, 2001] полагают, что цитокератины -19 и -15, высокий уровень β -катенина, не связанного с кадгерином, и p63, могут претендовать на роль маркеров СК в эпидерме. Однако для выделения СК вышеперечисленные маркеры использоваться не могут, так как представляют собой внутриклеточные белки. Наконец, надо отметить, что экспрессия некоторых потенциальных маркеров эпидермальных СК может быть взаимозависимой. Имеются некоторые доказательства перекрестной связи интегринов и кадгеринов в клетках и сигнальных систем Notch (рецептор Delta) и Wnt (стимулятор β -катенина) [Watt, 2001]. Следует отметить, что уровни экспрессии интегринов могут изменяться при переносе клеток из живой кожи

в условия культуры. В таких случаях польза интегринов как маркеров СК может несколько ограничиваться.

Рецептор трансферрина — еще один поверхностный маркер, в экспрессии которого у СК и ТАК выявляются различия. У СК кератиноцитов отмечают сниженную экспрессию рецепторов трансферрина, тогда как активно делящиеся клетки обогащены высокими уровнями экспрессии интегринов $\alpha 6$ и рецепторов трансферрина [56].

В последнее время исследуется значение отдельных биомолекул в процессе развития СК. В частности, сверхэкспрессия протоонкогена *c-myc* (транскрипционный регулятор пролиферации клеток многих типов, в том числе кератиноцитов кожи) у трансгенных мышей коррелирует с истощением СК в углублениях волосяных фолликулов. Примечательно то, что сверхэкспрессия *c-myc* влияет не только на превращение дочерних клеток СК в ТАК, но и на выбор направления дифференцировки [Watt, 2001]. Другой фактор, который связан с СК или их конверсией в ТАК — фактор транскрипции *p63* (гомолог *p53*), выражен в активно делящихся кератиноцитах кожи *in vitro* [50, 56]. У мышей с делецией гена *p63* обнаруживается глубокий дефект развития эпидермы. В раннем периоде развития, когда эпителий кожи представлен только одним слоем, кожа с нулевой экспрессией *p63* выглядит нормально. Но в процессе образования многослойности кожа с таким дефектом оказывается лишенной эпителия.

12.3. Мультипотентный потенциал стволовых клеток эпителия кожи

Факт того, что эпидермальные СК мультипотентны, хорошо известен и не вызывает сомнений [Watt, 1998; Panteleyev, et al., 2001]. Наиболее высокую мультипотентность имеют медленно циклирующие СК углублений волосяных фолликулов, которые также обладают самым высоким клоногенным потенциалом [Rochat, et al., 1994]. При поверхностных ожогах, оставляющих неповрежденными волосяные фолликулы, но разрушающих межфолликулярный эпидермис, не требуется пересадки кожи, тогда как после глубоких ожогов, повреждающих волосяные фолликулы, возобновление роста эпителия не происходит, за исключением роста с краев раны [56]. В связи с этим в течение уже почти трех десятилетий для лечения ожоговых повреждений с успехом применяются предшественники кератиноцитов [635].

Мультипотентные свойства СК углублений волосяных фолликулов проявляются в способности образовывать клетки всех линий эпителия кожи, включая межфолликулярный эпидермис, всех слоев волосяных фолликулов, а также клеток сальных и потовых желез. Как в нормальном состоянии, так и после раневого повреждения отмечается миграция клеток из волосяных фолликулов в межфолликулярный эпидермис, сальные и потовые железы [Oshima, et al., 2001; Taylor, et al., 2000]. Авторы работы [236] полагают, что СК, расположенные в волосяных фолликулах, являются производными СК нервного гребня и поддерживают свой мультилинейный дифференцировочный потенциал на протяжении всей жизни.

Хотя кератиноциты почти не упоминаются в многочисленных работах последнего времени, посвященных пластичности СК различных тканей, отдельные наблюдения все же позволяют предполагать о ее существовании. СК из эпидермиса новорожденных мышей, введенные в бластоцисты, способствовали образованию не только эктодермальных, но также мезенхимальных и нейральных тканей, в том числе эндотелия, кроветворных клеток и нейронов [454]. Sieber-Blum и соавторы установили, что СК, выделенные из волосяных фолликулов зрелой мыши, могут образовывать нейроны, миоциты, шванновские клетки, хондроциты и меланоциты, а также обладают способностью к самообновлению [Sieber-Blum, et al., 2004]. Сообщали также, что ТАК эпителия роговицы кролика и мыши после экспозиции с дермой эмбрионов мыши перепрограммировались и образовывали межфолликулярный эпидермис, себоциты, потовые железы и волосы [Ferraris, et al., 2000]. Отмечено также, что процесс конечной дифференцировки кератиноцитов может быть реверсирован введением вирусного онкогена [Bagrandon, Green, 1987]. Метаплазия эпителиальных клеток, в том числе кератиноцитов, также не является редкостью. К таким процессам образования одного дифференцированного типа

клеток из другого относится, например, образование эктопического эпителия кишечника в желудке или эндоцервикального эпителия во влагалище [Slack, 2000].

12.4. Регуляция судьбы стволовых клеток эпидермиса

Регуляция судьбы СК эпидермы, т. е. регуляция их линейной предрасположенности, касается определения способов действия молекул, включающих специфическую программу терминальной дифференцировки СК эпидермы. Эти вопросы представляют не только теоретический интерес, но также имеют большое значение для решения практических задач тканевой инженерии, лечебной и косметической медицины.

Для того чтобы вызвать конечную дифференцировку культивированных кератиноцитов, надо просто перевести их в суспензию. При этом как СК, так и ТАК прекращают деление и инициируют конечную стадию развития. Спустя 24 часа большинство клеток экспрессирует маркеры дифференцировки. Такую конверсию, индуцированную пребыванием клеток в суспензии, можно частично подавить связыванием $\beta 1$ интегринов белками ЭКМ или антителами к интегринам. Было установлено, что сигнал интегринов «не дифференцироваться», трансдуцированный занятыми рецепторами, активнее положительного сигнала «дифференцироваться», трансдуцированного незанятыми рецепторами [Watt, 2001]. Связывание лиганда необходимо как для адгезии, опосредованной интегринами, так и для дифференцировки, также регулируемой интегринами. Интегрины регулируют не только начало явной дифференцировки, но также морфогенез, снижение функции интегринов и экспрессии, обеспечивающей избирательную миграцию коммитированных клеток из базального слоя эпидермы.

Как отмечалось выше, СК имеют более высокие уровни β -катенина, не связанного с кадгерином, чем ТАК. Экспрессия доминантного β -катенин-негативного мутанта в кератиноцитах человека способствовала образованию незрелых колоний ТАК, тогда как экспрессия стабилизированного β -катенина увеличивала пропорцию предполагаемых СК в пролиферирующей популяции почти до 90 % [365]. При сверхэкспрессии стабилизированного β -катенина наблюдали эктопическое образование зачатков волосных фолликулов в коже развивающегося цыпленка [Watt, 2001].

Один из генов, который регулируется сигналом β -катенина, является *c-Myc*. Так как *c-Myc* способствует миграции кератиноцитов в компартмент ТАК *in vitro*, возможно, что есть обратная связь, включающая оба белка, которые контролируют соотношение СК и ТАК в эпидермисе [Watt, 2001]. Другие мишени β -катенина и *c-Myc* в кератиноцитах еще должны быть установлены. Возможно, например, что *c-Myc* вызывает снижение экспрессии интегринов [Gandarillas, Watt, 1997]. Но если может осуществляться перекрестная регуляция маркеров эпидермальных клеток, то же самое может происходить с молекулами, определяющими судьбу СК.

В регуляции баланса между пролиферацией и конечной дифференцировкой СК в постнатальных волосных фолликулах принимает участие целый ряд сигнальных молекул и регуляторных белков: молекулы Sonic hedgehog (Shh), костные морфогенетические белки (BMP) с их антагонистом Noggin, транскрипционные факторы Msx1 и Msx2, ядерный фактор kB [Niemann, Watt, 2002]. В линейной селекции внутри волосного фолликула участвуют фактор транскрипции Нохс13, рецептор Notch с его лигандами, регулятор Cut11 и др. Кроме факторов, действующих автономно, в регуляции эпидермальных СК могут также принимать участие межклеточные взаимодействия [365]. Одним из тех сигнальных путей, которые при этом вовлекаются, это сигнал от трансмембранного рецептора Notch, который связывается с трансмембранными лигандами, такими как Delta на ближайших клетках. Notch экспрессируется во всех слоях эпидермиса постнатального человека; Delta1 — лиганд Notch — ограничивается базальным слоем и наиболее выражен в кластерах клеток, экспрессирующих высокие уровни $\beta 1$ интегринов [Lowell, et al., 2000]. Высокая экспрессия Delta1 блокирует ответ эпидермальных СК на сигналы Notch и может повышать прочность контактов между кластерами СК, препятствуя смешиванию СК с близле-

жащими TAK. Активация Notch в клетках по краям кластеров СК стимулирует их превращение в TAK [Lowell, et al., 2000].

При обсуждении молекул, которые важны в регуляции судьбы эпидермальных СК, следует иметь в виду, что ключевые сигнальные молекулы интегрины, β -катенин и Notch в различных тканях и организмах имеют сходную роль [784]. Недавно было показано, что способность эпителиальных клеток кожи приобретать и/или сохранять свойства мультипотентных СК связана с сигнальным механизмом Wnt. В основе этого механизма находится мультифункциональный белок β -катенин, который стабилизируется после получения клетками сигнала Wnt. β -катенин необходим для активации белков членов семейства Lef/Tcf [Nusse, 1999]. У эмбриона сигналы Wnt воспринимаются мультипотентными эпителиальными клетками кожи еще до образования волосяных фолликулов. Когда специализированные мезенхимальные клетки кожи подавляют второй сигнальный механизм, представленный BMP, мультипотентные эпителиальные клетки начинают экспрессировать Lef1 и становятся коммитированными к образованию волосяных фолликулов [Jamora, et al., 2003]. У мышей с нарушением функции Lef1, Noggin или β -катенина повреждается способность образовывать волосяные фолликулы [56]. После рождения мультилинейный потенциал сохраняют только СК углублений волосяных фолликулов. Однако у трансгенных мышей, у которых содержание β -катенина конститутивно стабилизировано, межфолликулярный эпидермис взрослых животных может сам, также как кожа эмбриона, определить свою судьбу и стать либо волосяным фолликулом, либо эпидермой. Исследователи обратили внимание, что когда специализированные мезенхимальные клетки (сосочковые клетки дермы) получают Wnt сигнал из волосяных фолликулов, они продолжают сохранять способность индуцировать волосяные фолликулы. Следовательно, сигналы Wnt могут воздействовать как на клетки эпителия, индуцируя у них свойства СК, так и на мезенхимальные клетки, поддерживая их способность мобилизовать СК [56].

Решающее значение в определении исхода линейной дифференцировки СК может иметь степень активности Lef1/Tcf. При чрезмерной экспрессии Lef1 в коже и эпителии ротовой полости обнаруживают развитие волос и зубов в несвойственных местах. При сверхэкспрессии разновидности Lef1, неспособной к соединению с β -катенином, клетки волосяных фолликулов могут превращаться в клетки сальных желез, располагающихся в необычных местах, а на месте волосяных фолликулов могут образоваться эпидермальные кисты [Jamora, et al., 2003]. При удалении β -катенина из клеток кожи наблюдалось развитие эпидермальных кист вместо волосяных фолликулов [Huelsken, et al., 2001].

В связи с этим большой интерес может представить изучение действия на СК кожи других белков, влияющих на активность Lef1/Tcf [Brantjes, et al., 2002]. Кроме того, имеется ряд сообщений, которые предполагают еще более выраженную роль β -катенина и его сигналов в определении судьбы СК [Korinek, et al., 1998; Reya, et al., 2001; Wong, et al., 2002]. В этом отношении интересны также данные Kielman и др. [Kielman, et al., 2002], которые, изучая линейную дифференцировку ЭСК, предположили дозозависимое влияние сигнала β -катенина на развитие аденоматозного полипоза кишечника.

Потенциал применения СК эпителия в заместительной, регенеративной, косметической медицине и тканевой инженерии трудно переоценить. В первую очередь необходимо разработать методы культивирования, обеспечивающие рост кератиноцитов в виде конфлюентных пластов эпителия для восстановления кожи при ожогах, хронических язвах и ранах. Преимущество таких методов заключается в использовании собственной кожи больного. К сожалению, выращивание эпителиального покрова *in vitro* за счет СК пациента требует определенного времени, в течение которого больной может быть инфицирован.

Культированные эпителиальные СК кожи могут быть использованы также для генной терапии врожденных заболеваний кожи, а также в биоинженерии. Пока нельзя сказать, обладают ли СК кожи достаточной пластичностью, чтобы дифференцироваться в некератиноцитарные типы клеток для коррекции других тканей. Тем не менее, работы, проведенные в последние десятилетия, показывают, что исследования СК кожи имеют большие перспективы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г. и др. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют фенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток // Трансплантология. — 2008. — Т. 10, 1. — С. 306–308.

Barrandon Y., Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 2302–2306.

Brantjes H., Barker N., van Es J., et al. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 383. — P. 255–261.

Cotsarelis G., Sun T.-T., and Lavker R. M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis // Cell. — 1990. — Vol. 61. — P. 1329–1337.

Gandarillas A., Watt F.M. c-Myc promotes differentiation of epidermal stem cells // Genes Dev. — 1997. — Vol. 11. — P. 2869–2882.

Hematti P., Sloan E. M., Carvallo C. A., et al. Absence of donor-derived keratinocyte stem cells in skin tissues cultured from patients after mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation // Exp. Hematol. — 2002. — Vol. 30. — P. 943–949.

Huelsken J., Vogel R., Erdmann B., et al. β -catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin // Cell. — 2001. — Vol. 105, 4. — P. 533–545.

Jahoda C.A.B., Reynolds A. J. Hair follicle dermal sheath cells — unsung participants in wound healing // Lancet. — 2001. — Vol. 358. — P. 1445–1448.

Jamora C., Das Gupta R., et al. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development // Nature. — 2003. — Vol. 422. — P. 317–322.

Kielman M.F., Rindapaa M., Gaspar C., et al. Arc modulates embryonic stem cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling // Nat. Genet. — 2002. — Vol. 32. — P. 594–605.

Korinek V., Barker N., Moerer P., et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4 // Nat. Genet. — 1998. — Vol. 19. — P. 379–383.

Lowell S., Jones P., Le Roux I., et al. Stimulation of human epidermal differentiation by Notch/Delta signalling at the boundaries of stem cell clusters // Curr. Biol. — 2000. — Vol. 10. — P. 491–500.

Mackenzie I. C. Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure // J. Invest. Dermatol. — 1997. — Vol. 109. — P. 377–383.

Niemann C., Watt F.M. Designer skin: Lineage commitment in postnatal epidermis // Trends Cell. Biol. — 2002. — Vol. 12. — P. 185–192.

Nusse R. WNT targets. Repression and activation // Trends Genet. — 1999. — Vol. 15. — P. 1–3.

Oshima H., Rochat A., Kedzia C., et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells // Cell. — 2001. — Vol. 104. — P. 233–245.

Panteleyev A. A., Jahoda C. A., Christiano A. M. Hair follicle predetermination // J. Cell Sci. — 2001. — Vol. 114. — P. 3419–3431.

Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // Nature. — 2001. — Vol. 414. — P. 105–111.

Reynolds A. J., Jahoda C. Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis // Development. — 1992. — Vol. 115. — P. 587–593.

Rochat A., Kobayashi K., Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis // Cell. — 1994. — Vol. 76. — P. 1063–1073.

Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y. F., et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle // Dev. Dyn. — 2004. — Vol. 231, N.2. — P. 258–269.

Slack J. M. Stem cells in epithelial tissues // Science. — 2000. — Vol. 287. — P. 1431–1433.

Taylor G., Lehrer M. S., Jensen P. J., et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis // Cell. — 2000. — Vol. 102. — P. 451–461.

Wang X., Montini E., Al-Dhalimy M., et al. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation // Am. J. Pathol. — 2002. — Vol. 161. — P. 565–74.

Watt F.M. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* — 1998. — Vol. 353. — P. 831–837.

Wilson C., Cotsarelis G., Wei Z.G., et al. Cells within the bulge region of mouse hair follicle transiently proliferate during early anagen: heterogeneity and functional difference of various hair cycles // *Differentiation*. — 1994. — Vol. 55. — P. 127–136.

Wong M.H., Huelsken J., Birchmeier W., Gordon J.I. Selection of multipotent stem cells during morphogenesis of small intestinal crypts of Lieberkuhn is perturbed by stimulation of Lef-1/beta-catenin signalling // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 15843–15850.

ГЛАВА 13. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ГЕНЕЗЕ И РЕАЛИЗАЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ ЖЕЛЕЗ

13.1. Молочная железа

Молочная железа у человека и других млекопитающих является динамическим органом, который подвергается значительным изменениям во время беременности, лактации и инволюции. СК молочной железы образуют клетки 3-х типов, которые определяют ее дольчато-альвеолярную структуру: 1) миоэпителиальные клетки, образующие базальный слой протоков и альвеол; 2) эпителиальные клетки протоков, выстилающие их люминальную поверхность; 3) альвеолярные эпителиальные клетки, синтезирующие протеины молока [2]. Под регулирующим влиянием сигнальных белков, гормонов и местных эпителиально-стромальных взаимодействий клетки молочной железы при каждой беременности и лактации интенсивно пролиферируют и дифференцируются, а во время инволюции часть клеток подвергается апоптозу.

Эпителиальные клетки протоков могут в условиях *in vitro* превращаться в миоэпителиальные клетки, что предполагает возможность наличия в молочной железе прогениторных клеток [1]. По данным Stingl и др. [4], основанных на экспрессии гликопротеина MUC-1, антигена CALLA (common acute lymphoblastic leukaemia antigen, CD10) и эпителиально-специфического антигена (ESA) прогениторные клетки молочной железы подразделяются на два специфических фенотипа. К первому типу относятся альвеолярные прогениторы MUC-1⁺/CALLA⁺/ESA⁺, которые экспрессируют типичные люминальные эпитопы (цитокератин-8/18, цитокератин-19, MUC-1 и ESA) и имеют низкие уровни экспрессии миоэпителиальных эпитопов (цитокератин-14 и CD44v6). Ко второму типу клеток-предшественников протоков относятся клетки с фенотипом MUC-1^{-/lo±}/CALLA^{±lo±}/ESA⁺, которые *in vitro* образуют смешанные колонии люминальных и миоэпителиальных клеток.

Наличие в молочной железе самообновляющихся мультипотентных СК четко продемонстрировано при изучении трансплантации фрагментов эпителия этой железы мышам и крысам. Клетки эпителия молочной железы, маркированные опухолевым вирусом молочной железы мыши, при трансплантации в жировую подушечку железы, очищенную от эпителиальных элементов, регенерируют новую молочную железу. При исследовании этих культур были выявлены свойства, присущие СК других органов, такие как длительное сохранение метки, включающейся в ДНК; исключение краски Hoechst; наличие антигена Sca-1. Было установлено, что Sca-1-позитивные клетки эпителия молочной железы в описанных культурах обладали более высоким регенеративным потенциалом, чем Sca-1-негативные. Спустя 9 недель после трансплантации эпителиальные клетки, сохраняющие метку, составляли 3–5 % популяции [5]. Liu и др. [3] разработали собственную систему для культивирования эпителиальных стволовых/прогениторных клеток молочной железы человека. Эпителиальные клетки молочной железы, выделенные во время редукционной маммопластики, при росте на неадгезивном субстрате (Matrigel) в присутствии ростовых факторов образовывали сферические колонии, которые были названы «маммосферами». В процессе культивирования происходило обогащение маммосфер стволовыми/прогениторными клетками, способными к самообновлению и мультилинейной дифференцировке. При сочетанном введении клеток маммосфер и фибробластов молочной железы человека наблюдали полное восстановление молочной железы в очищенной жировой подушечке иммунодефицитных NOD/SCID мышей [3]. Применение этой культуральной системы позволило авторам начать изучение путей, регулирующих самообновление и дифференцировку СК нормальной молочной железы человека. Было показано, что в развитии молочной железы большое значение имеют сигнальные системы Hedgehog, Notch и Wnt.

13.2. Предстательная железа

Простата состоит из железистого эпителия, заключенного в фиброзно-мышечную строму. Эпителий представлен двумя слоями гистологически отличающихся клеток: секреторного люминального слоя из высоких колоночных клеток, которые характеризуются присутствием про-

статического специфического антигена (PSA), простатической кислой фосфатазы (PAP) и калликрейна 2; и базального слоя, состоящего из кубовидных клеток, расположенных на базальной мембране из экстраклеточного матрикса (рис. 13.1). Между базальными и люминальными клетками простатического эпителия редко рассеяны нейроэндокринные клетки, представляющие третий эпителиальный тип клеток простаты. Нейроэндокринные клетки не экспрессируют ни рецепторов андрогенов, ни антиапоптозного онкогена Bcl-2 и считаются непролиферирующими клетками, достигшими конечной стадии дифференцировки. Функция нейроэндокринных клеток полностью не выяснена; предполагается, что они имеют отношение к росту и дифференцировке простаты и могут вовлекаться в карциногенез. Нейроэндокринные клетки характеризуются экспрессией хромогранина А, серотонина, бомбазина, кальцитонина, VIP (вазоактивного пептида кишечника), а также белков, связанных с паратиреоидным гормоном.

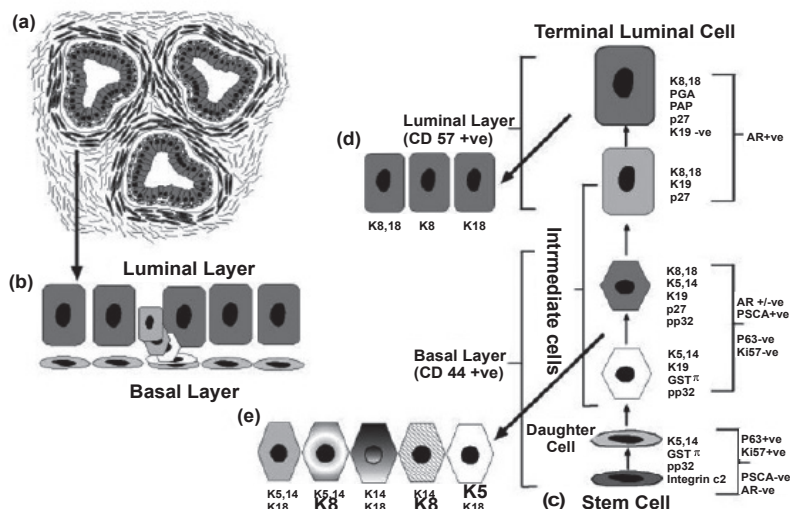


Рис. 13.1. Схематическое представление процесса дифференцировки в эпителиальных клетках простаты

(а) Поперечный срез простаты, выявляющий железистый эпителий, заключенный в фиброзномышечную строму;

(в) Схематическое представление двух гистологически отличающихся эпителиальных слоев; показана миграция клеток из базального слоя в люминальный слой во время дифференцировки;

(с) Эволюция эпителиальных фенотипов от базальной СК до конечно дифференцированной секреторной люминальной клетки;

(d) Субпопуляции конечно дифференцированных люминальных клеток;

(е) Промежуточные фенотипы и экспрессия в них цитокератинов (K).

AR — рецептор андрогенов

По работе [Long et al., 2005]

Базальные клетки являются андрогеннезависимыми клетками, экспрессирующими высокомолекулярные цитокератины (K); главным образом K-5 и K-14, но также K-10, K-11, K-15 и K-17), CD44, и некоторые другие маркеры: p63 (гомолог p53), интегрин α 2, c-met (мембранный рецептор для HGF), HER-2 (рецептор EGF) и пр. Люминальные клетки состоят из андрогензависимых клеток, экспрессирующих низкомолекулярные цитокератины (K-8 и K-18), а также CD57, простатоспецифический мембранный антиген (PSMA) и рецепторы андрогенов, опосредующие образование PSA и PAP.

В процессе изучения простаты было установлено, что некоторые эпителиальные клетки железы экспрессируют комбинации маркеров базальных и люминальных клеток. Эти клетки получили название «промежуточные клетки». In vitro «промежуточные клетки» четко подразделяются на 2 популяции: одна состоит из ранних недифференцированных клеток, экспрессирующих

CD44 и часто p63, но не содержащих антиген стволовых клеток простаты (PSCA); другая — содержит CD44⁺ и PSCA⁺ клетки, но уже утрачивает p63, т. е. является дифференцированной популяцией. Определенным этапом в развитии клеток простаты может быть появление рецепторов андрогенов. Клетки, которые не экспрессируют рецепторы андрогенов, являются менее дифференцированными, а экспрессирующие — приближаются к конечному фенотипу дифференцировки. Степень апоптоза и пролиферации значительно отличается в базальном и люминальном слоях, обуславливая региональную гетерогенность клеток в простате [Rizzo, et al., 2005].

СК простаты, образующие все типы эпителиальных клеток, находятся, по всей вероятности, среди клеток базального слоя. Процессы дифференцировки СК простаты зависят от баланса между эстрогенами и андрогенами. Первые доказательства в пользу наличия СК в простате были получены в опытах на крысах. При кастрации животного люминальные клетки, составляющие до 90 % клеток эпителия простаты, подвергаются апоптозу, но базальный слой клеток остается при этом интактным. После введения андрогенов эпителий простаты полностью восстанавливается [Verhagen, et al., 1988]. Последующие чередования отмены и введения андрогенов подтвердили способность СК простаты к самообновлению. Было сделано заключение, что у крыс, и аналогично у человека, андрогеннезависимые СК образуют андрогензависимые дифференцированные клетки люминального слоя через андрогеннезависимую транзиторную делящуюся популяцию [Isaacs, Coffey, 1989]. Казалось бы, что отсутствие роста андрогеннезависимых клеток при отмене андрогенов противоречит предложенной теории. Однако этому факту [Hayward, et al., 1997] нашли приемлемое объяснение. По их мнению, клеточное деление управляется андрогенами не прямым путем, а опосредованно EGF, который образуется гладкомышечными клетками.

Успехи в развитии культуральных систем дали возможность получить некоторые представления о фенотипе СК простаты. При культивировании эпителиальных клеток этой железы на фибродермном слое из облученных клеток 3Т6 образуются колонии двух типов — I и II. Колонии типа I содержат как базальные клетки, экспрессирующие цитокератин-14, так и более дифференцированные клетки, экспрессирующие цитокератин-8 — маркер люминальных клеток. Небольшое число, приблизительно 10 %, клеток из колоний типа I образуют колонии типа II. По сравнению с колониями типа I они больше по размерам и содержат плотно упакованные мелкие клетки, экспрессирующие почти исключительно цитокератин-14 — показатель низкого уровня дифференцировки. Предполагают, что приблизительно 2 % клеток в колониях типа II являются СК [Rizzo, et al., 2005]. Другие авторы показали, что у безтимусных мышей nude ксенотрансплантаты клеток колоний типа II, экспрессирующие высокие уровни β1интегрина, образуют трехпространственные дифференцированные секреторные структуры, подобные акцинам простаты [Collins, et al., 2001]. В качестве другого потенциального маркера СК простаты рассматривался p63 [Tran, et al., 2002], который часто называют ранним маркером базальных клеток. Несмотря на то, что p63 вряд ли специфичен для СК, по его экспрессии удается выявить популяцию, содержащую СК [Long, et al., 2005].

Было установлено, что эпителий простаты содержит клетки боковой популяции (side population, SP), которые составляют 1,38 % эпителиальных клеток и отличаются крайне низкой активностью клеточного цикла [Bhatt, et al., 2003]. Предполагают, что клетки SP, показывающие низкую флуоресценцию при окрашивании красителем Hoechst 33342, обогащены СК. Другим возможным маркером СК является гликопротеин клеточной поверхности CD133. Richardson и др. установили, что небольшое число клеток простаты экспрессируют CD133. Эти клетки составляют приблизительно 0,75 % общей популяции базальных клеток. Они отличаются адгезией и высоким уровнем экспрессии интегринов (α2β1). Большая часть CD133⁺ клеток экспрессирует цитокератины K-5 и K-14. При трансплантации мышам nude простатических CD133⁺ или CD133⁻ клеток с добавлением стромальных клеток человека только CD133⁺ клетки дифференцировались не только в базальные, но и в люминальнорасположенные клетки простаты, положительно окрашиваясь на K-8, PAP и рецепторы андрогенов [Richardson, et al., 2004].

В нормальных тканях гомеостаз поддерживается благодаря балансу между самообновлением и потерей СК вследствие их дифференцировки или апоптоза. Этот баланс обеспечивается взаимодействием клеток с ЭКМ, растворимыми факторами и клетками ниши. ЭКМ простаты состоит из коллагена типа IV, ламинина и протеогликана гепарансульфата. Главная функция ЭКМ заключается в образовании поляризованных клеточных доменов путем перестройки цитоскелета, вызванной адгезией клеток к матриксу, которая опосредуется интегринами и межклеточными взаимодействиями [Long, et al., 2005]. В экспериментах *in vitro* установлено, что культуры эпителиальных клеток-предшественников простаты человека более активно дифференцируются в зрелые клетки, если растут в присутствии экстраклеточного компонента. В таких условиях опухолевые клетки простаты линии PC3, не экспрессирующие рецепторов андрогенов и не образующие PSA, дифференцируются в сфероиды железистого типа, продуцирующие PSA [Lang, et al., 2001]. Пространственное расположение и полярность клеток составляют, таким образом, основу процесса дифференцировки, на который влияют ростовые факторы.

Главный метаболит андрогенов в простате — 5 α дигидротестостерон (DHT), который имеет существенное значение для стимуляции образования факторов роста и дифференцировки. DHT связывается с рецепторами андрогенов клеток стромы и опосредует освобождение факторов роста, которые запускают дифференцировку эпителиальных клеток. Предполагают, что в нормальном окружении клетки дифференцируются обычным образом. Однако при изменении клеточного окружения может происходить несвойственная дифференцировка, которая может инициировать раковый процесс. Наиболее часто это, вероятно, происходит во время превращения андрогенонезависимого фенотипа в андрогенозависимый [Long, et al., 2005]. Некоторые из факторов, которые обеспечивают самообновление СК, вовлекаются также в контроль раковых СК. Это сигнальные системы Delta/Notch, hedgehog и трансформирующий фактор роста β (TGF β) [Rizzo, et al., 2005].

Рецептор Notch и его лиганд Delta участвуют как в развитии тканей, так и в их последующем поддержании. Подавление экспрессии Notch у клеток простаты мышей сопровождалось угнетением морфогенеза, роста и дифференцировки СК предстательной железы во время развития, а у кастрированных мышей препятствовало возобновлению роста простаты, запускаемому введением андрогенов.

Рецепторы Patched и Smoothed и их лиганд Hedgehog (Hh) передают сигнал фактору транскрипции GLI. Функционирование этой системы было установлено при развитии базальноклеточной карциномы, медуллобластомы и рака простаты [Stecca, et al., 2005]. Другие авторы показали, что блокирование сигнала Hh циклопамином подавляет рост клеток рака простаты как *in vitro*, так и *in vivo*. После кастрации блокирование системы Hh антителами к Hh или циклопамином подавляло регенерацию простаты, вызванную удалением железы [Karhadkar, et al., 2004].

В поддержании СК в состоянии покоя участвует также TGF β , образуемый клетками стромы. В доброкачественной аденоме простаты действие этого фактора проявляется в подавлении пролиферации эпителия и индукции его апоптоза. Антагонистом TGF β в опухолевых клетках является Bcl-2, высокие уровни которого призваны, вероятно, защитить клетки от апоптоза, индуцированного TGF β .

Клетки стромы простаты способны образовывать ростовые факторы, относящиеся к 8 различным семействам [Wong, Wang, 2000]. Представители 5 семейств образуют факторы, вовлекающиеся в регуляцию пролиферации и дифференцировки эпителия. Они включают TGF, FGF, IGF, TGF и HGF [Long, et al., 2005].

IGF — функциональный гомолог инсулина, который оказывает митогенное действие на эпителиальные клетки простаты. Рецепторы IGF находятся на базальных клетках. Семейство FGF состоит из 10 факторов роста, 7 из которых определяются в простате. Все члены этого семейства являются митогенами для клеток стромы, за исключением FGF-7 и FGF-10 (прямого стимулятора пролиферации эпителиальных клеток). Рецепторы факторов этого семейства идентифици-

рованы как в строме, так и на клетках эпителия. Щелочной FGF стимулирует пролиферацию стромальных, но не эпителиальных клеток, тогда как кислый FGF не обнаруживается в нормальной простате, но выявляется при доброкачественной гиперплазии простаты и дисплазии люминальных клеток. TGF- β 1 играет важную роль в регуляции дифференцировки простаты и роста раковых клеток железы. В доброкачественной аденоме этот фактор подавляет пролиферацию и индуцирует апоптоз в эпителии. Он также способен подавлять пролиферацию стромальных клеток и поддерживает гомеостаз простаты. EGF стимулирует рост эпителия, а TGF- α , член семейства EGF, принимает участие в дифференцировке эпителия. HGF может подавлять пролиферацию и вызывать дифференцировку нормальных эпителиальных клеток простаты. Кроме вышеназванных, другие факторы также могут влиять на судьбу простатических клеток. Например, ретиноевая кислота влияет на citoархитектонику и подавляя пролиферацию клеток простаты содействует их дифференцировке. Известно, что строма опухоли отличается от нормальной стромы [Cunha, et al., 2003], что указывает на ее роль в развитии СК предстательной железы.

Следует отметить, что простата является удобной естественной моделью для изучения биологии СК. Нормальное развитие этого органа и сохранение его железистой структуры возможны только при андрогенной стимуляции. После удаления андрогенов наблюдается регрессия простаты, а при их введении железа восстанавливается. Стволовые и транзиторные амплифицирующиеся клетки обеспечивают основу, которая позволяет выяснить, как поддерживается рост и сохраняется структура этого органа. Изучение процессов дифференцировки нормальных и опухолевых клеток простаты может явиться основой для разработки методов лечения рака простаты.

13.3. Гипофиз

Аденогипофиз у человека развивается на 4-м месяце беременности. Дифференцировка клеток начинается уже на 8–9-й неделе эмбриогенеза, когда появляются базофильные клетки, а несколько позже и ацидофильные клетки. Начало секреторной активности аденогипофиза, которое связывают с появлением гранул (6-я неделя), было установлено при первых же электронно-микроскопических исследованиях гипофиза. Тогда же были открыты фолликуло-звездчатые клетки (ФЗК), в названии которых подчеркнуты морфологические черты этих клеток звездчатого типа с длинным вытянутым телом и характерные особенности их эпителиально-фолликулярной структуры. Одна из самых ранних гипотез, касающаяся функции ФЗК, предполагала их участие в восстановлении переднего гипофиза после повреждения. Эта гипотеза Yoshimura на современном этапе подвергается переосмысливанию в свете последних данных о СК [Horvath, Kovacs, 2002].

Было обнаружено, что ФЗК вовлекаются в трофические, катаболические и транспортные процессы гипофиза. Кроме того, ФЗК обладают свойствами дендритных клеток, а также макрофагов, что связывает их с моноклеарной фагоцитарной системой. ФЗК являются источником многих ростовых факторов и пептидов, таких как bFGF, VEGF и фоллистатин, а также цитокинов, таких как LIF, IL-6 и MIF. Было также выявлено, что ФЗК реагируют на β -адренергические стимулы и накапливают цАМФ при β -адренергической стимуляции [Allaerts, Vankelecom, 2005]. Всеобщее внимание к этим клеткам привлекла их роль в образовании оксида азота, особенно после того, как было установлено значение этого оксида в регуляции секреции гипофизарных гормонов [Ceccatelli, et al., 1993]. Наконец, при участии ионов Ca^{2+} ФЗК осуществляют реализацию кооперации в переднем гипофизе при действии физиологических стимулов и, обладая рецепторами тиротропного гормона (ТТГ), обеспечивают ультракороткую петлю регуляции секреции ТТГ.

Популяция ФЗК состоит из нескольких типов клеток. В одной субпопуляции ФЗК выявлена коэкспрессия специфического для нервной ткани белка S-100 и GFAP; у другой — экспрессию S-100 и кератина, у третьей — экспрессию S-100 или GFAP и виментина. У 10–20 % S-100-позитивных клеток обнаружена сочетанная экспрессия S-100 и антигенов МНС класса II. Кроме того, у небольшого числа S-100-позитивных клеток выявлена экспрессия нестина — белка промежуточных филаментов нейроэпителиальных клеток, первоначально выявленного в НСК, а за-

тем обнаруженного также в стволовых/прогениторных клетках ряда тканей [Krylyshkina, et al., 2005]. Идентификация отдельных популяций ФЗК осложняется еще и их иммуногистохимическим, морфологическим и ультраструктурным сходством с дендритными клетками.

В ряде работ приводятся доказательства, но пока только косвенные, о роли ФЗК в качестве региональных СК переднего гипофиза. Некоторые авторы [Inoue, et al., 2002] сообщили, что ФЗК могут дифференцироваться в клетки скелетных мышц при трансплантации гипофиза под капсулу почки. Эти данные были подтверждены исследованиями *in vitro* [Mogi, et al., 2004], в которых показана дифференцировка клеток линии TtT/GF, представляющей собой иммортализованную линию ФЗК из тиротропной опухоли гипофиза мыши, в поперечнополосатые мышцы. Субпопуляция ФЗК, экспрессирующая мРНК белка S-100, при проточной цитофлуориметрии клеток аденогипофиза обнаруживалась в боковой популяции [Allaerts, Vankelecom, 2005]. Между тем известно, что клетки подобного типа во многих тканях представляют популяцию, обогащенную стволовыми/прогениторными клетками. По данным Vankelecom, клетки SP переднего гипофиза также проявляют некоторые характеристики СК.

13.4. Щитовидная железа

Щитовидная железа (ЩЖ) состоит из двух типов эндокринных клеток: фолликулярных клеток, синтезирующих тиреоидные гормоны (трийодтиронин и тироксин); и парафолликулярных С-клеток, образующих кальцитонин. Эти клетки имеют различное происхождение. С-клетки имеют нейроэктодермальное происхождение и образуются из клеток нервного гребня. Во время эмбриогенеза зачаток ЩЖ сливается с жаберными телами, происходящими из каудальных глоточных углублений, в которые на более ранних стадиях внедрились клетки нервного гребня. Предшественники фолликулярных клеток образуются из энтодермы мешковидного образования передней части пищеварительного тракта, теряющего связь с кишечной трубкой и перемещающегося по шеи до претрахеальной позиции. Таким образом, развитие ЩЖ включает направленное перемещение примордиальных клеток из разных зародышевых листков, приводящее в конечном итоге к образованию сложного органа.

Fagman и др. [230] выделяют следующие морфогенетические этапы развития ЩЖ: формирование энтодермальной плакиды, перемещение почкоподобного зачатка, образование симметричных долей и окончательный органогенез, связанный с возникновением большого числа фолликулов. Для ранних стадий развития ЩЖ решающее значение имеет сочетанное действие факторов транскрипции *Titf1/Nkx2.1* (прежде известного как тиреоидный транскрипционный фактор -1; TTF-1), *Fox1* (прежде известного как TTF-2) и *Rax8*. Транскрипционные мишени и эффекторные молекулы, вовлекающиеся в развитие ЩЖ, остаются неизвестными. В последнее время было установлено, что на последних стадиях морфогенеза ЩЖ в ее регуляцию вовлекается гликопротеин *Sonic hedgehog* (Shh), но так как клетки мигрирующего зачатка ЩЖ не экспрессируют генов этого сигнального белка, предполагают, что его действие является вторичным по отношению к другим не автономным для клеток процессам. У взрослых наличие главного регулятора функции ЩЖ для образования и конечной дифференцировки этого органа не требуется. С клинической точки зрения выяснение морфогенетических механизмов развития ЩЖ является очень важным, поскольку нарушение эмбрионального развития ЩЖ может объяснить возникновение большинства случаев врожденного гипотиреоза [230].

Механизм, инициирующий первичную спецификацию ЩЖ, неизвестен. Предполагают, что индуктивный сигнал исходит из мезенхимальных клеток, как это описано для многих других процессов развития. Вместе с тем установлено, что мезенхима к начальной плакоте ЩЖ не приближается, а абсолютное большинство клеток-предшественников зачатка ЩЖ с момента своего появления и вплоть до стадии почкования контактирует с эндотелиальным покрытием аортальной сумки (aortic sac) — сосуда, располагающегося дистальнее общего выносящего сердечного тракта [230]. Известно, что взаимодействие мест спецификации энтодермы с эмбриональными сосудами имеет решающее значение для нормального развития ряда органов, например, пече-

ни и ПЖ [Matsumoto, et al., 2001; Lammert, et al., 2001; Lammert, et al., 2003; Yoshitomi, et al., 2004]. В связи с этим авторы работы [230] предполагают, что контакт с эндотелием аортальной сумки является важной особенностью раннего органогенеза ЩЖ. Однако это не отрицает возможность влияния на развитие ЩЖ мезенхимы, окружающей аортальную сумку, из которой образуется миокардиальная стенка выносящего тракта. Известно, что FGF, происходящие из клеток сердечной мезодермы, индуцируют экспрессию *Titf1/Nkx2.1* в раннем зачатке легких, определяя судьбу первичных легочных клеток, происходящих, также как зачаток ЩЖ, из эндодермы передней кишки [Serls, et al., 2005]. У трансгенных мышей с дефицитом FGF10 ЩЖ отсутствует [Ohuchi, et al., 2000], а главным источником FGF10 вблизи плагоды ЩЖ являются клетки-предшественники сердца [Kelly, et al., 2001]. На основании вышесказанного можно полагать, что раннее развитие ЩЖ индуцируется и регулируется факторами, происходящими из эндотелия сосудов и мезенхимы.

До недавнего времени изучение биологии фолликулярных клеток ЩЖ (тироцитов) проводилось на первичных культурах этих клеток, полученных из ЩЖ плодов или взрослых животных или из иммортализованных («бессмертных») линий тироцитов крыс FRTL-5 и PC C1-3. Однако эти культуры для изучения молекулярных основ развития и функционирования ЩЖ не пригодны. В связи с этим была поставлена цель получения тироцитов из ЭСК, выделенных из ВМБ. При культивировании ЭСК мышей и эмбрионных телят, дифференцированных из них, в определенных условиях, включающих 6–12-дневную обработку тиреоидстимулирующим (тиротропным) гормоном гипофиза (TSH), были получены адгезивные тироцитоподобные клетки, экспрессирующие все гены, традиционно связываемые с тироцитами. Методом PCR-RT в этих клетках обнаруживались транскрипты мРНК генов следующих клеточных компонентов: тиреоидного фактора транскрипции *Рax8*; Na^+/I^- импортера (NIS; который транспортирует йодиды в тироциты); тиреоглобулина (Тг; предшественника тиреоидных гормонов); тиропероксидазы (ТРО; фермента, ответственного за йодирование Тг) и рецепторов TSH (TSHR) [Lin, et al., 2003]. Было выявлено значение сохранения в полученных модельных клетках такой тиреоид-специфической функции, как образование цАМФ под влиянием TSH. В последующих работах [Marians, et al., 2002; Arufe, et al., 2006] была поставлена задача получить мутантных мышей с отсутствием рецепторов TSH (TSHR-null) для изучения функции этих рецепторов *in vivo*. У мышей TSHR-null наблюдали тяжелый врожденный гипотиреоз и гипоплазию ЩЖ, приводящие к смерти животных в возрасте 4-х недель. У гетерозиготных мышей (TSHR^{+/-}) ЩЖ не была поражена. Эти работы имеют важное значение не только в плане изучения нормального развития ЩЖ, но также для выяснения механизмов, лежащих в основе заболеваний человека.

Ключевую роль в дифференцировке тироцитов играет транскрипционный фактор *Рax8*, который входит в семейство парных домен-содержащих генов, экспрессия которых выявляется в развивающихся почках, нейральной трубке и развивающейся и взрослой ЩЖ. *Рax8* связывается с единичными участками промоторов генов Тг и тиропероксидазы (ТРО) и в обоих случаях место присоединения *Рax8* перекрывается участком связывания тиреоидного транскрипционного фактора-1 (ТТФ-1). В случае промоторов Тг все мутации, препятствующие связыванию *Рax8*, значительно снижают связывание ТТФ-1, затрудняя получение заключения, какой из этих двух факторов более важен в экспрессии промотора на этом участке. Напротив, в отношении промоторов ТРО обнаружили мутацию, которая препятствовала связыванию только *Рax8* и значительно снижала при этом активность промоторов, обеспечивая веское доказательство важной роли *Рax8* в тиреоидспецифической экспрессии генов. Кроме того, было обнаружено, что трансфекция *Рax8* в нетиреоидные клетки вызывает быстропроходящую активацию транскрипции ТРО и на много более низком уровне промоторов Тг. Все эти данные позволили предположить, что эти два тиреоидспецифических гена являются мишенями действия *Рax8* [576]. До настоящего времени у мышей и человека идентифицировано 9 генов *Рax*, кодирующих факторы транскрипции, и в 5 из них выявлялись мутации, связанные с врожденными заболеваниями человека или спонтанными мутациями мышей. Путем анализа трансгенных и нокаутных линий мышей уста-

новили, что гены *Rax* являются ключевыми регуляторами решающих этапов органогенеза почек, глаз, уха, носа, мышц конечностей, спинного и головного мозга и ЩЖ [576]. Нокаутные по *Rax8* мыши имеют очень маленькую ЩЖ, лишенную фолликулярных клеток. У больных врожденным гипотиреозом часто обнаруживают мутации генов *Rax8* [576].

До настоящего времени не проведены исследования, посвященные изучению состояния СК у больных с заболеваниями ЩЖ. Между тем, даже сравнение этого состояния у лиц с повышенной и пониженной тиреоидной функцией представляет достаточный интерес. Но особую значимость эта проблема имеет в связи с потенциальной возможностью применения индуцированных аутологических СК для лечения недостаточности функции ЩЖ, приводящей к гипотиреозу. Гипотиреоз часто развивается после беременности, операций на ЩЖ по поводу болезни Грейвса (тиреотоксикоза), простого зоба, узлообразования, а также у пожилых лиц. В популяции старше 60 лет у 14,4 % обследованных определялись повышенные уровни TSH в крови как показатель ранней стадии тиреоидной недостаточности [Rosenthal, et al., 1987]. В негериатрической популяции с бессимптомным аутоиммунным тиреоидитом ежегодный риск развития явного гипотиреоза варьирует от 5 % до 7,3 %. Лечение гипотиреоза тиреоидными гормонами даже в физиологических дозах может аgravировать заболевание коронарных сосудов. Кроме того, у пожилых лиц часто развиваются негативные реакции на лекарственные препараты или снижается клиренс используемого для лечения тироксина, увеличивая возможность развития ятрогенного тиреотоксикоза пожилых [Rosenthal, et al., 1987]. В связи со всем сказанным, применение СК в качестве источника фолликулярных клеток ЩЖ для заместительной терапии имеет высокий терапевтический потенциал.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Allaerts W., Vankelecom H. History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research // Eur. J. Endocrinol. — 2005. — Vol. 153. — P. 1–12.

Arufe M. C., Lu M., Kubo A., et al. Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into thyroid follicular cells // Endocrinology. — 2006. — Vol. 147. — P. 3007 — 3015.

Bhatt R. I., Brown M. D., Hart C. A., et al. Novel method for the isolation and characterization of the putative prostatic stem cell // Cytometry. — 2003. — Vol. 54A. — P. 89.

Collins A. T., Habib F. K., Maitland N. J., et al. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression // J. Cell Sci. — 2001. — Vol. 114. — P. 3865.

Cunha G. R., Hayward S. W., Wang, Y. Z., et al. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate // Int. J. Cancer. — 2003. — Vol. 107. — P. 1–10.

Gudjonsson T., Villadsen R., Nielsen H. L., et al. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties // Genes Dev. — 2002. — Vol. 16. — P. 693–706.

Hayward S. W., Rosen M. A., Cunha G. R. Stromal–epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate // Br. J. Urol. — 1997. — Vol. 79, Suppl. 2. — P. 18.

Hennighausen L., Robinson G. W. Signaling pathways in mammary gland development // Dev. Cell. — 2001. — Vol. 1. — P. 467–475.

Horvath E., Kovacs K. Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? // Ultrastructural Pathology. — 2002. — Vol. 26. — P. 219–228.

Inoue K., Mogi C., Ogawa S., et al. Are folliculo-stellate cttls in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? // Arch. Physiol. Biochem. — 2002. — Vol. 110. — P. 50–53.

Isaacs J. T., Coffey D. S. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia // Prostate. — 1989. — Vol. 2. — P. 33.

Karhadkar S. S., Bova G. S., Abdallah N., et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis // Nature. — 2004. — Vol. 431. — P. 707.

Kelly R. G., Brown N. A., Buckingham M. E. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in the pharyngeal mesoderm // Dev. Cell. — 2001. — Vol. 1. — P. 435–440.

- Krylyshkina O., Chen J., Mebis L., et al.* Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells // *Endocrinology*. — 2005. — Vol. 146. — P. 2376–2387.
- Lammert E., Cleaver O., Melton D.* Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels // *Science*. — 2001. — Vol. 294. — P. 564–567.
- Lammert E., Cleaver O., Melton D.* Role of endothelial cells in early pancreas and liver development // *Mech. Dev.* — 2003. — Vol. 120. — P. 59–64.
- Lang S.H., Sharrard R.M., Stark M., et al.* Prostate epithelial cell lines form spheroids with evidence of glandular differentiation in three-dimensional Matrigel cultures // *Br. J. Cancer*. — 2001. — Vol. 85. — P. 590–599.
- Lin R., Kubo A., Keller G.M., et al.* Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells in vitro // *Endocrinology*. — 2003. — Vol. 144. — P. 2644–2649.
- Liu S., Dontu G., Wisha M.* Mammary stem cells, self-renewal pathways and carcinogenesis // *Breast cancer research*. — 2005. — Vol. 7, 3. — P. 86–95.
- Long R.M., Morrissey C., Fitzpatrick J.M.* Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies // *Clin. Science*. — 2005. — Vol. 108. — P. 1–11.
- Marians R.C., Ng I., Blair H.C., et al.* Defining thyrotropin-dependent and — independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor null mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — Vol. 99. — P. 15776–15781.
- Matsumoto K., Yoshitomi H., Rossant J., et al.* Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function // *Science*. — 2001. — Vol. 294. — P. 559–563.
- Mogi C., Miyai S., Nishimura Y., et al.* Differentiation of skeletal muscle from pituitary folliculo-stellate cells and endocrine progenitor cells // *Exp. Cell Res.* 2004. — Vol. 292. — P. 288–294.
- Ohuchi H., Hori Y., Yamasaki M., et al.* FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2000. — Vol. 277. — P. 643–649.
- Postiglione M.P., Parlato R., Rodriguez-Mallon A., et al.* Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 2002. — Vol. 99. — P. 15462–15467.
- Prabhakar B.S., Bahn R.S., Smith T.Y.* Current perspective on the pathogenesis of Graves disease and ophthalmopathy // *Endocrine Reviews*. — 2003. — Vol. 24, 6. — P. 802–835.
- Richardson G.D., Robson C.N., Lang S.H., et al.* CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells // *J Cell Sci.* — 2004. — Vol. 117. — P. 3539–3545.
- Rizzo S., Attard G., Hudson D.L.* Prostate epithelial stem cells // *Cell Prolif.* — 2005. — Vol. 38. — P. 363–374.
- Rosenthal M.J., Hunt W.C., Garry P.J., et al.* Thyroid failure in the elderly. Microsomal antibodies as discriminant for therapy // *JAMA*. — 1987. — Vol. 258, 2. — P. 209–213.
- Serls A.E., Doherty S., Parvatiyar P., et al.* Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung // *Development* 2005. — Vol. 132. — P. 35–47.
- Stecca B., Mas C., Altaba A.R.* Interference with HH-Gli signaling inhibits prostate cancer // *Trends Mol. Med.* — 2005. — Vol. 11. — P. 199.
- Stingl J., Eaves C.J., Kuusk U., et al.* Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast // *Differentiation*. — 1998. — Vol. 63. — P. 201–213.
- Tran C.P., Lin C., Yamashiro J., et al.* Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cell // *Mol. Cancer Res.* — 2002. — Vol. 1. — P. 113–121.
- Verhagen A.P., Aalders T.W., Ramaekers F.C., et al.* Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration // *Prostate*. — 1988. — Vol. 13. — P. 25.
- Verhagen A.P., Ramaekers F.C., Aalders T.W., et al.* Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer // *Cancer Res.* — 1992. — Vol. 52. — P. 6182.

Welm B.E., Tepera S.B., Venezia T., et al. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population // *Dev. Biol.* — 2002. — Vol. 245. — P. 42–56.

Wong, Y.C., Wang, Y.Z. Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development // *Int. Rev. Cytol.* — 2000. — Vol. 199. — P. 65–116.

Yoshitomi H., Zaret K.S. Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor *Ptf1a* // *Development.* — 2004. — Vol. 131. — P. 807–817.

ГЛАВА 14. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА

Костный мозг (КМ) — ткань мезодермального происхождения, состоящая из сложного кроветворного компонента, поддерживаемого клетками стромы, которые в зоне своего влияния создают многофакторный экстраклеточный фон. КМ содержит, по крайней мере, три типа стволовых клеток: гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК). Эти 3 типа клеток могут происходить от общей примитивной бластоподобной клетки — гемангиобласта [153]. Предположение о существовании данного типа клеток выдвинул Вильгельм Хиз еще в 1900 г. И только в 2004 г. анализ дифференцировки одиночных CD133-позитивных клеток позволил доказать существование гемангиобластов в костном мозге взрослого человека [Loges, et al., 2004].

14.1. Костный мозг и гемопоэз

Гемопоэз у взрослого человека происходит в красном костном мозге, который находится в основном внутри тазовых костей, а также внутри эпифизов длинных трубчатых костей и тел позвонков. Клетки крови в подавляющей массе относятся к зрелым, полностью дифференцированным и не способным к пролиферации элементам. Они образуются из пролиферирующих морфологически опознаваемых клеток различных линий дифференцировки (эритроцитарной, тромбоцитарной, гранулоцитарной, моноцитарной, лимфоцитарной и др.). Но ни одна из этих клеточных линий не способна к длительной пролиферации. В процессе нескольких (обычно не более 5–6) делений эти клетки подвергаются конечной дифференцировке. Их предшественниками являются морфологически не опознаваемые клетки, которые можно различить только по способности к образованию в специальных культурах специфических колоний. Эти клетки также имеют относительно короткий цикл и ограниченную пролиферативную способность. Самые ранние из них могут делиться не более 20–22 раз [11]. Но многие клетки крови нуждаются в непрерывном пополнении; человеку необходимо каждый день до 500 миллиардов новых кроветворных клеток [208]. Гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК) обеспечивает непрерывное образование этих клеток.

14.1.1. Гемопоэтические стволовые клетки

Нормальная функция ГСК — продолжительное мультилинейное воспроизведение всех клеточных элементов миелоидной (эритроциты, тромбоциты, гранулоциты, моноциты) и лимфоидной (В-, Т-лимфоциты) систем. Самой примечательной чертой ГСК является их способность обеспечивать на протяжении всей жизни организма баланс между самовозобновлением, интенсивной пролиферацией и дифференцировкой в функционирующие коммитированные клеточные линии. Из всех мультипотентных СК человека ГСК охарактеризованы лучше всего. Это типичнейшие СК, наиболее активные в преодолении линейных барьеров, редко представленные в организме (одна ГСК на 10^4 – 10^5 клеток общей популяции крови) и имеющие замедленный клеточный цикл [482, 599]. Морфологически ГСК напоминают лимфоциты. Содержание ГСК в нормальной крови по крайней мере в 10 раз ниже, чем в КМ, в связи с чем выделение ГСК из периферической крови с целью последующей трансфузии себя не оправдывает. Однако путем предварительной обработки донора циклофосфамидом и/или ростовыми факторами, такими как G-CSF, можно стимулировать выход ГСК из КМ. В этом случае периферическая кровь будет являться не первоисточником, а временным местом содержания ГСК КМ, т. е. средой, используемой для их извлечения [22]. В фазе покоя ГСК рефрактерны к внешним сигналам, исходящим от ростовых факторов или цитокинов. При выходе из состоя-

ния покоя они отвечают на дифференцировочные сигналы и дают начало гемопоэтическим предшественникам [681].

При трансплантации одиночной ГСК в сингенный организм она способна репопулировать кроветворную систему реципиента [402]. Большинство ГСК в течение первого дня после введения возвращается в полость КМ — то место в организме, которое способно поддерживать их экспансию [392]. В осуществлении хоуминга ГСК в КМ большая роль принадлежит интегринам, таким как VLA-4, и рецепторам адгезии, таким как CD44. Хемокин стромальный фактор 1 (stromal derived factor-1, SDF-1), который образуется клетками стромы КМ и связывается с рецепторами CXCR4 на ГСК, имеет первостепенное значение в механизме хоуминга, активируя через внутриклеточные сигналы различные молекулы клеточной адгезии. Другой рецептор, значение которого в процессе хоуминга и клеточной экспансии также предполагается, это c-kit, обеспечивающий прикрепление ГСК к строме через SCF, связанный с мембраной [599]. Миграцию ГСК в противоположном направлении (из КМ в кровь) обеспечивают другие факторы, например, G-CSF. Установлено также, что протеазы нейтрофилов способны расщеплять основные молекулы адгезии и освобождать СК из их ниш [447].

14.1.2. Маркеры гемопоэтических стволовых клеток

ГСК всегда рассматриваются как гетерогенная популяция, хотя на основании ряда поверхностных маркеров они могут быть до определенной степени очищены [482]. Одним из наиболее важных этапов в изучении ГСК было открытие сиаломуцина (CD34) — поверхностного антигена кроветворных клеток, который представляет собой мембранный гликопротеид массой около 110 кДа, несущий несколько сайтов гликозилирования. Предшественники ГСК, находящиеся в покое фибробластоподобные СК (CD34⁻), при выходе в сосудистое русло приобретают антиген CD34, а по возвращении в полость КМ могут терять его под воздействием микроокружения. В связи с тем, что экспрессия CD34 снижается по мере созревания клеток, этот антиген стали применять для выделения ГСК. Не так давно появились данные, свидетельствующие о том, что не все ГСК экспрессируют CD34 [482]. В настоящее время считают, что у человека, как и у мышей, репопулирующие ГСК находятся в обеих субпопуляциях: CD34⁺ и CD34⁻ клеток. Предполагают, что CD34⁻ клетки более примитивные, чем CD34⁺, и что CD34⁺ ГСК могут превращаться в CD34⁻ клетки и наоборот [402]. Большинство CD34⁻ СК находится в покое и не реагирует на внешние сигналы, такие как цитокины [Huss, et al., 2000]. Тем не менее, авторам работы [Lange et al., 1999] удалось полностью восстановить лимфогемопоэтическую систему летально облученных сингенных мышей-реципиентов иммортализованным CD34⁻ клоном ГСК.

Функция антигена CD34 связана с взаимодействием ранних предшественников гемопоэза со стромой с участием L-селектина [22]. По наличию антигена CD34 на поверхности клетки можно только приблизительно оценить содержание ГСК в суспензии, поскольку его экспрессируют также стромальные и эндотелиальные клетки КМ [674, 692]. По мере коммитированности уровень экспрессии CD34 снижается с одновременным увеличением экспрессии другого антигена CD38 — интегрального мембранного гликопротеида молекулярной массой 46 кДа, обладающего NAD-гликогидролазной и ADP-рибозилциклазной активностями. На роль ГСК претендуют CD34⁺CD38⁻ клетки, тогда как популяция клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁺, составляющая более 90 % CD34⁺ клеток в КМ, содержит коммитированные предшественники кроветворных клеток.

У ГСК обнаруживают также антиген CD133 (AC133), который маркирует в зависимости от источника клеток как CD34⁻ субпопуляцию, так и часть CD34⁺ субпопуляции [Tarasov A.I., et al., 2004, 482]. Предполагают, что CD133 является маркером самых ранних СК, обладающих высоким потенциалом роста [292]. По нашим данным, его экспрессия на CD34⁺ клетках фетальной печени составляет около 30 % [Tarasov A.I., et al., 2004]. Антиген Thy-1 (CD90), который ко-экспрессируется с рецептором c-kit (CD117), представляет собой поверхностный фосфатидилинозитол-связывающий гликопротеин молекулярной массой 25–35 кДа, участвующий в адгезии клеток. Показано [Bouscary, et al., 2000], что в популяции CD34⁺Thy1⁺ имеют-

ся клетки, способные к самовозобновлению и образованию длительно культивируемых линий. Однако наличие маркера Thy1 является недостаточным для идентификации ГСК, так как содержание Thy1⁺ клеток в CD34⁺ популяции составляет около 50 %, что значительно превышает процентное содержание ГСК. Обобщая мнение различных авторов, наиболее вероятными претендентами в ГСК являются клетки, на поверхности которых экспрессированы антигены CD34, AC133 и Thy1 и отсутствуют CD38, HLA-DR и линейные маркеры дифференцировки, в совокупности обозначаемые как «Lin»: гликофирин A, CD3, CD4, CD8, CD10, CD14, CD16, CD20 [22]. Другие маркеры, иногда используемые для выделения СК с кроветворным потенциалом, включают сосудистый эндотелиальный рецептор 2 фактора роста (VEGFR-2), погруженный в домен рецептора киназы (KDR); CD117 (c-kit); CD164; рецептор хемокина CXCR4 (CXCR-4); Р-гликопротеиновый рецептор лекарственной резистентности (MDR); Sca-1; AA4; CD45 и др. [482]. Выраженность этих маркеров зависит от типа клеток и онтогенетической стадии развития. Некоторые из комбинаций маркеров, такие как c-kit^{high}, Thy-1.1^{low}, Lin^{-low} и Sca-1⁺ или CD34^{low/-}, c-kit⁺, Sca-1⁺ и Lin⁻, применялись для получения почти чистой популяции ГСК мышей [Osawa, et al., 1996]. Аналогично, комбинация CD34⁺, Thy1⁺, CD38^{-low} и Lin⁻ использовалась для очистки популяций ГСК человека [516]. Сотрудники лаборатории Terry Fox (Канада), тщательно исследующие возрастные различия СК у человека, для выявления ГСК используют фенотип CD34⁺CD45Rα^{low}CD71^{low}. Клетки, описываемые данной формулой, оказались функционально неотличимыми от CD34⁺CD38⁻ клеток [22]. В лаборатории Weissman используют для определения ГСК человека следующую формулу: CD34⁺ Thy1⁺ CD38^{low/-} c-kit^{-low} [207]. 30 клеток, выделенные по данной схеме, полностью восстанавливали кроветворение летально облученных мышей за период не менее 7 недель. Хотя считают, что одной выжившей ГСК достаточно, чтобы репопулировать всю кроветворную систему, замедленное восстановление из единственной клетки несовместимо с жизнью [207]. У мышей 100 введенных ГСК являются защитной дозой для 95–100 % летально облученных сингенных мышей, тогда как 5000–10000 клеток необходимо для быстрого приживания [Uchida et al., 2001]. Эта доза эквивалентна 2,5–5×10⁵ клеток/кг, которая близка к дозе CD34⁺ Thy1⁺ клеток человека, быстро разрастающихся после аутологичной трансплантации [Archimbaud, 1997].

Для выделения СК КМ эффективным также оказалось применение суправитальных красителей. С помощью красителя ДНК Hoechst 33342 получили возможность проводить разделение клеток КМ на основе интенсивности флуоресценции. Суспензии с низкой флуоресценцией, оказались обогащенными ГСК [Baines, Visser, 1983]. Ядерные клетки, проявляющие слабую флуоресценцию родамина 123 (потенциалзависимый митохондриальный краситель, который выводится из клеток переносчиком P170), также проявляли свойства ГСК КМ [Bertoncello et al., 1985].

ГСК КМ непрерывно и обратимо изменяют свой фенотип [605, 607]. Многие описанные фенотипы клеток могут быть представлены только у единичных клеток, находящихся в различных функциональных состояниях. Более примитивные СК являются теми клетками популяции, которые часто или непрерывно входят в цикл [Bradford et al., 2004; Pang et al., 2004]. По данным Quesenberry, et al. [606, 607], во время цикла деления у ГСК КМ выявляли значительные, но обычно обратимые изменения репопуляционной способности [Habibian et al., 1998; Lambert et al., 2003], содержания прогениторных клеток [166], экспрессии генов [Lambert et al., 2003] и белков адгезии [252], а также фенотипа дифференцировки [166]. В любое время даже высокоочищенные ГСК гетерогенны в отношении многих функциональных характеристик [165, 166]. Предполагают, что прогениторные и энергично растущие резервные СК могут быть одними и теми же клетками, но находящимися в различных функциональных состояниях, вероятно связанных с фазой клеточного цикла [606].

Комбинации маркеров CD34⁺, CD38⁻, Lin⁻, CD90⁺, CD133⁺ и флуоресцентные субстраты для альдегиддегидрогеназы (фермент, играющей ключевую роль в программе дифференцировки ГСК) были разработаны для очистки ГСК человека в ограниченном объеме, но в клинической практике обычно используют обогащение по одному маркеру, чаще всего CD34. Этим методом

получают популяции с высоким содержанием ГСК и прогениторных клеток, которые обеспечивают такое же быстрое восстановление кроветворной системы у больных, как после применения высокоочищенных популяций [208].

Ни один из маркеров ГСК, применяемых в настоящее время, прямо не связан с главной функцией ГСК, и поэтому даже внутри вида маркеры могут различаться в зависимости от стадий развития и активации клеток. Несмотря на это, отмечается четкая взаимосвязь маркеров ГСК у различных видов, таких как, например, человек и мышь. Однако до тех пор пока определение полного набора генной экспрессии ГСК не обеспечит получение маркеров, связанных с сохранением «стволовости» этих клеток, для идентификации ГСК будут необходимы функциональные тесты.

14.1.3. Регуляция дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток костного мозга

Белок p21^{cip1/waf1} (p21) и белок Bcl-2 играют решающую роль в регуляции дифференциации ГСК [Marone, 2002]. Белок p21 является ингибитором циклин-зависимых киназ и опосредует задержку клеточного цикла в фазе G1 [184]. У трансгенных мышей, имеющих конституционный недостаток этого белка, наблюдается более высокая пролиферация СК, приводящая к истощению их пула [146]. Предполагают, что белок p21 может быть переключателем молекулой, способной регулировать входение ГСК в клеточный цикл. При наличии этого белка сохраняется потенциал ранних прогениторов, несмотря на экспансию клеток, вызванную цитокинами. Напротив, потеря экспрессии белка p21 во время экспансии клеток приведет к тому, что полученные в этих условиях ранние CD34⁺ прогениторные клетки будут дифференцироваться.

Прямая роль антиапоптозного белка Bcl-2 в регуляции судьбы ГСК предполагается по аналогии с результатами исследований, полученными на трансгенных мышах со сверхэкспрессией Bcl-2. У этих мышей обнаруживают более высокое содержание ГСК в КМ при меньшем числе ГСК в фазе S/G2/M. Цикл ГСК у этих животных более замедленный, а способность к росту в культуре выше. Эти данные предполагают, что сверхэкспрессия Bcl-2 способствует сохранению ГСК в незрелом состоянии [366].

Факторы, определяющие судьбу ГСК в КМ, т. е. влияющие на ее предназначение: остаться ли ей стволовой клеткой, подвергнуться ли дифференцировке или начать процесс апоптоза (запрограммированной смерти) — находятся на стадии изучения. У инбредных линий мышей выявлены различия в содержании ГСК и состоянии их клеточного цикла. Клонирование генов, ответственных за эти различия, должно помочь выяснить механизмы, которые определяют размер популяции ГСК и поддерживают баланс между дифференцировкой, самовозобновлением и апоптозом [207, 208]. ГСК — редкие клетки, которые в тканевой культуре не размножаются. В виде гомогенной популяции они могут быть выделены только в небольшом количестве. Это ограничивает их анализ на молекулярном и биохимическом уровнях. Развитие биотехнологии, в частности PCR, сделало возможным получение многих копий сДНК из очень ограниченного числа клеток. Ряд лабораторий в настоящее время изучают полученные таким образом данные.

Кроме такого системного подхода к изучению регуляторов ГСК пытаются охарактеризовать группы генов, которые определяют судьбу клеток в КМ и некроветворных тканях. У млекопитающих во многих типах кроветворных клеток экспрессированы гены рецепторов Notch, тогда как в стромальных клетках экспрессированы гены, кодирующие их лиганды, подобные Delta (Dlk) и Jagged 1 (Jag 1) [цит. 207]. Тщательное изучение образцов экспрессии разных членов этого семейства генов у ГСК и поведение очищенных ГСК, стимулированных различными лигандами, позволяет выяснить потенциальную роль семейства этих рецепторов в определении судьбы ГСК и более коммитированных прогениторов.

Другое семейство генов, играющих существенную регуляторную роль в процессах развития, — это гены гомеобокса [22]. У млекопитающих гены гомеобокса (Hox) класса I организованы в 4 кластера, меченых от A до D. Многие из этих генов экспрессированы в кроветворных клетках.

Вовлечение этих генов в развитие кроветворных клеток было показано при аномалиях кроветворных органов у мышей null мутантов *Nox*. Недавно было изучено влияние сверхэкспрессии генов *Nox* на образование кроветворных клеток. У мышей с аберрантной экспрессией генов *Nox* выявили наличие кроветворных фенотипов *NoxA9*, *NoxA10*, *Nox B3*, *NoxB4*, *NoxB8* и *NoxC8*. Наиболее интересным оказался фенотип *NoxB4*, у обладателей которого сверхэкспрессия вызывала избирательную экспансию наиболее примитивных кроветворных клеток [цит. 207].

В последнее десятилетие охарактеризовано также много генов, вовлекающихся в запрограммированную смерть клеток. К ним относятся позитивные регуляторы (*Fas* рецептор и его лиганд; каспазы, и некоторые члены семейства *Bcl2*, такие как *Bax* и *Bad*) и ингибиторы (*Bcl2* и *Bcl-x_L*, ингибиторы каспаз, такие как модификатор А реакции цитокинов (*CrmA*)) апоптоза. Сообщали, например, об экспрессии *Bcl-x* в примитивных кроветворных предшественниках человека и о положительном окрашивании на *Fas* рецептор у ГСК (*CD34⁺*, *CD38⁻*) плода человека. Возможно, что экспрессия *Fas* в ГСК не конститутивная, а индуцируется в определенных условиях. У мышей, например, повышение уровня *Fas* в кроветворных прогениторных клетках отмечается при РТПХ [207].

Значение апоптоза в регуляции кроветворения и роль цитокинов в противодействии этому влиянию особенно прояснились после получения null мутантных и трансгенных мышей. У *Bcl2* null мутантных мышей выявили тяжелые поражения лимфоидных органов, тогда как *Bcl-x* null мутантные мыши погибали во время эмбриогенеза от тяжелой кроветворной недостаточности. Повышение радиоустойчивости ГСК при чрезмерной экспрессии *Bcl2* и повышенная устойчивость ГСК к действию цитотоксинов при отсутствии *p53* подтверждают, что блокирование индукции апоптоза в ГСК может быть полезно при проведении терапии. Повышенное выживание ГСК *in vivo* может быть обеспечено несколькими подходами: например, обработкой цитокинами, которые увеличивают число ГСК или блокируют действие факторов, подавляющих их пролиферацию. Устойчивая экспансия ГСК может также эффективно достигаться при использовании факторов, которые увеличивают популяцию стромальных клеток, создающих микроокружение [207].

14.1.4. Потенциал дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток

Исследования последнего десятилетия показывают, что ГСК обладают потенциалом к образованию не только клеток крови, но также и других тканей: кости, хряща, эндотелия кровеносных сосудов, эпителия, печени, нервной системы и т. д. Конкретные результаты этих исследований будут рассмотрены в соответствующих разделах. Здесь же уместно отметить, что некоторые авторы считают, что ГСК могут вызывать образование предшественников всех соматических эктодермальных, мезодермальных и энтодермальных линий [247, 557]. В частности, Blau [102] вообще предполагает, что все клетки КМ имеют некоторую степень «стволовитости» («stemness») и в надлежащих условиях могут быть способны проявлять это качество, продуцируя большое разнообразие некроветворных клеток. Возможность образования негемопоэтических клеток обычно объясняется высокой пластичностью ГСК, т. е. ее способностью трансдифференцироваться в клетки других линий. Теоретически это может быть возможным в двух случаях: или ГСК перепрограммируется и принимает судьбу унипотентной стволовой клетки другой линии, или ГСК возвращается на одну или несколько ступеней назад в своем дифференцировочном развитии, что сопровождается их дедифференцировкой до мультипотентной стволовой клетки, способной образовывать клетки в пределах одного зародышевого листка, или даже плюрипотентной стволовой клетки, дающей рост клеток всех трех зародышевых листков. В любом случае, гипотетическая возможность пластичности ГСК и ее способности трансдифференцироваться открывает перспективу использования этих клеток в качестве универсального источника стволовых клеток для реконструктивной медицины. Такая перспектива была в свое время подкреплена рядом исследований, продемонстрировавших замечательный регенеративный потенциал ГСК на животных моделях, например, при экспериментальном инфаркте миокарда [Orlic, et al., 2001], повреждении спинного мозга и поражении печени [Petersen, et al., 1999].

Однако после этих первых многообещающих сообщений последующие попытки использования ГСК КМ для репарации поврежденных органов показали противоречивые результаты. Последующие эксперименты, выполненные на высокоочищенных популяциях ГСК, показали, что они не столь эффективны в восстановлении функции поврежденных органов, по крайней мере, сердца [Murry, et al., 2004] и мозга [Castro, et al., 2002].

В ответ на эти неожиданные результаты научный мир разделился во взглядах на концепцию клеточной пластичности. Противоречия полученных результатов пытаются объяснить несовершенством моделей повреждения тканей, химеризмом клеток и пр. Особого внимания заслуживает рассмотрение вопроса о гетерогенности популяции ГСК [Ratajczak, et al., 2007]. Kucia и др. [410] обнаружили, что очищенная популяция CXCR4⁺, CD34⁺, AC133⁺, CD45⁻ клеток КМ, отличаясь по фенотипу от ГСК, так же, как и последние, обладает высокой пластичностью. Эти авторы предположили, что пластичность и способность к трансдифференциации в различные ткани у препаратов ГСК, полученных как ими, так и другими исследователями [402, 403, 441], объясняется примесью тканекоммитированных СК (ТКСК). Такое предположение позволяет объяснить, почему мРНК и белковые маркеры, специфические, например, для нейральных ТКСК, выявляются в очищенных CD34⁺ клетках человека [Goodell et al., 1997; Padovan et al., 2003], а маркеры скелетных мышц — в CD34⁺, AC133⁺ клетках, выделенных из КМ или периферической крови [748]. Kucia et al. полагают, что содержание ТКСК в КМ очень небольшое, и у молодых лиц лишь одна из 10³–10⁴ моноклеарных клеток КМ экспрессирует поверхностные маркеры ТКСК [410].

Вышеприведенные данные указывают на то, что присутствие в КМ стволовых клеток, отличающихся по фенотипу от ГСК, могут иметь решающее значение в регенерации поврежденных тканей. Таким образом, несмотря на существенный прогресс в понимании клеточных и молекулярных механизмов самовозобновления и дифференцировки ГСК — пожалуй, наиболее изученной модели стволовой системы, многие вопросы остаются открытыми. Ответы на значительную часть этих вопросов могут быть получены при изучении взаимодействия ГСК с негемопоэтическими клетками стромы костного мозга.

14.2. Строма костного мозга

Строма КМ состоит из различных типов клеток, обеспечивающих структурную и функциональную поддержку гемопоэзу. Стромальная клеточная система, впервые описанная Owen M. в середине 80-х годов прошлого столетия, до сих пор вызывает повышенный интерес в связи с ее ролью в клеточной трансплантации и клеточной инженерии. Она включает клетки стромы КМ, поддерживающие гемопоэз; клетки соединительной ткани (остеоциты, хондроциты, ретикулоциты, теноциты, фибробласты, адипоциты и гладкомышечные клетки), а также МСК и их потомство. Стромальные клетки располагаются в специфическом экстраклеточном матриксе, пронизанном кровеносными сосудами и капиллярами. Среди этих клеток особая роль в поддержании гемопоэза принадлежит фибробластоподобным клеткам.

Первичная строма КМ формируется в результате сложных событий, происходящих после дифференцировки примитивных остеогенных клеток, образования рудиментов кости и их сосудистой инвазии. Гетерогенная природа стромальной популяции КМ становится явной при исследовании отдельных колоний. Они отличаются большим разнообразием размеров, зависящим от темпов роста, и морфологией клеток, среди которых можно видеть как ФБПК, так и большие плоские клетки [90]. Фенотипическая гетерогенность проявляется после культивирования колоний в течение примерно 20 дней. Некоторые колонии показывают резко положительное окрашивание на ЩФ, тогда как другие — дают отрицательную реакцию, а третьи — проявляют положительную реакцию в центре и отрицательную — на периферии [248]. Некоторые колонии образуют узелки (инициация минерализации матрикса), которые могут быть выявлены окрашиванием на кальций. Другие колонии накапливают жир, а отдельные — образуют хрящ. По данным Pittenger и др. [593], примерно 1/3 первичных адгезивных колоний стромы КМ обладают мультипотентностью и способны к дифференцировке в остеогенную, хондрогенную или липогенную линии.

К настоящему времени накоплено много данных, свидетельствующих о том, что экспансии какой-либо специализированной ткани предшествует развитие клеток стромы. Стромальная клеточная система организована аналогично кроветворной системе. В КМ клетки стромы заполняют все пространство между капиллярами (синусоидами) и костью и состоят в основном из 4-х типов клеток: макрофагов, адипоцитов, остеоцитов и ретикулоцитов. Постоянно находящиеся внутри КМ МСК поддерживают определенный уровень самообновления и генерируют клетки, которые могут дифференцироваться в различные линии соединительной ткани [181, 565–567]. При культивировании строма КМ может иметь относительно простой или сложный состав клеток в зависимости от примененной среды и условий роста. В самом КМ «ретикулярные клетки», положительно окрашивающиеся на ПЦФ, тесно прилегают к кроветворным клеткам [90]. Предполагают, что адипоциты и ПЦФ-позитивные ретикулярные клетки являются альтернативными фенотипами стромы, содержание которых регулируется окружением КМ [91].

14.2.1. Формирование микроокружения ГСК клетками стромы костного мозга

Клетки стромы КМ создают для ГСК так называемую нишу — специфическое окружение, включающее цитокины, хемокины, молекулы адгезии, кроветворные и некроветворные факторы роста, белки экстраклеточного матрикса (рис. 14.1). Одни из этих факторов продуцируются конституитивно, другие — появляются только после стимуляции [181, 510]. Некоторые ростовые факторы, экспрессирующиеся в МСК в стандартных условиях культивирования, а также после стимуляции IL-2 приведены в табл. 14.1. Эти факторы поддерживают кроветворение, способствуя взаимодействию клетки с клеткой, а также контролируя пролиферацию, выживание и дифференцировку ГСК. Кроме того, стромальные клетки экспрессируют многочисленные рецепторы, обеспечивающие адгезивные взаимодействия клеток с матриксом и между собой [181]. Среди них семейство интегринов (ICAM), обеспечивающих связывание с фибронектином, ламинином и коллагеном; молекулы адгезии сосудистого эндотелия VCAM-1 (CD106); молекулы адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток PECAM-1 (CD31), L-селектин и P-селектин, а также антигены CD40, CD34, CD43, имеющие сродство к гиалуроновой кислоте, фибронектину и/или сиаломуцинам. Все эти данные позволяют предполагать, что клетки стромы и, в частности, МСК способствуют реализации функции клеток своего микроокружения.

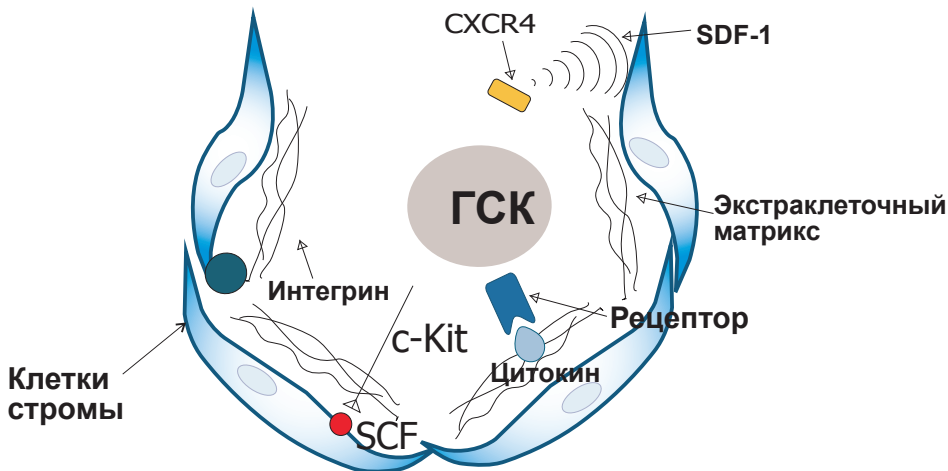


Рис. 14.1. Микроокружение гемопоэтической стволовой клетки

Важным фактором гомотипического связывания кроветворных клеток-предшественников и стромальных клеток является CD164-рецептор, причастный к обеспечению хоуминга ГСК [Zannettino, et al., 1998], а также рецепторы лигандов, подобных гиалуронину и остеопонтину,

которые играют основную роль в организации экстраклеточного матрикса КМ и кости, соответственно [335]. Для МСК КМ особенное значение имеет выраженная экспрессия CD44 [270]. При использовании антител к антигену CD44 (для блокирования содействия стромальных клеток кроветворению) было установлено, что CD34⁺ ГСК человека для начала развития нуждаются в запускающем сигнале, опосредованном CD44 [270].

Таблица 14.1

Экспрессия ростовых факторов в долговременных культурах мезенхимальных стромальных клеток КМ человека

Без индукции	Индукцированные IL-1 (10–100 ед/мл)	Экспрессия не обнаруживалась
IL-6	IL-1	IL-2
IL-7	IL-1β	IL-3
IL-8	IL-6	IL-4
IL-11	IL-8	IL-10
IL-12	IL-11	IL-13
IL-14	G-CSF	
IL-15	GM-CSF	
LIF	LIF	
M-CSF		
Flt-3 лиганд		
SCF		

По данным Azizi, et al., 1998. Гены ростовых факторов определялись PCR-RT при долговременном культивировании МСК в стандартных условиях.

В ряде работ отмечено положительное влияние культур стромальных клеток на поддержание кроветворной клеточной экспансии *ex vivo* [181, 474, 475]. Культивируемые МСК, даже в отсутствие цитокинов, способствуют сохранению ГСК; и в смешанных культурах отмечается более активная экспансия ГСК. В расширенных культурах мезенхимальной стромы выявляется экспрессия активности многих факторов роста, поддерживающих кроветворение. Наиболее полный спектр таких факторов роста приведен в работе [Azizi, et al., 1998] (табл. 14.1). По данным Rafi et al. [611, 612], длительное кроветворение в культурах эндотелиальных клеток, происходящих из КМ, зависит от таких факторов, как G-CSF, GM-CSF, M-CSF, c-kit лиганд, IL-6, FLK-2 и LIF. Другие авторы [307] в качестве факторов, способствующих кроветворению, называют еще IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, stem cell factor, FL3 лиганд и M-CSF, TGF-β.

Функциональное значение каждого ростового фактора ниши в определении судьбы ГСК пока остается неизвестным. Предполагают, что факторы из семейств TGF-β ускоряют деление СК, сохраняя свойства их «бессмертности» [Whetton, Graham, 1999]. Stem cell factor (SCF), рецептор которого c-Kit-лиганд экспрессирован на поверхности ГСК, существует в свободной и мембранносвязанной формах. Причем для фиксации ГСК в нише мембранносвязанная форма более важна, чем растворимая. Колоние-стимулирующие факторы (M-CSF, GM-CSF), FGF, IL-3 также находятся в нише не в растворимой форме, а специфически связаны с молекулами внеклеточного матрикса, такими как гепаран-сульфат, что позволяет создать высокую локальную концентрацию ростовых факторов.

ГСК, со своей стороны, экспрессируют различные молекулы адгезии, которые связываются с внеклеточным матриксом. Так, ГСК экспрессируют гепарин-связывающий белок, L-селектин, мицин-подобные молекулы, также 4 типа β1-интегринов: VLA-2 взаимодействует с коллагеновым рецептором, VLA-4 и VLA-5 — с фибронектиновым, а VLA-6 — с ламининовым. Структура этих трансмембранных белков напоминает жесткий стержень, перпендикулярный поверхности СК, с множественными гликозилированными сайтами, которые могут взаимодействовать с рецепторами соответствующих белков стромы. Интегрины удерживают ГСК в правильном месте в нише, а нарушение их экспрессии вызывает ее выход из ниши, что влечет за собой дифференцировку или гибель путем апоптоза. Интересно, что интерлейкины и ростовые факторы

стромы способны временно активировать интегрины VLA-4, VLA-5 и таким образом усиливать адгезивность СК.

Кроме обеспечения тесного контакта клетки с клеткой и образования ростовых факторов, способствующих кроветворению, мезенхимальные стромальные клетки могут также участвовать в направленном переносе ГСК в КМ, индуцируя рецепторы хоуминга. Peled и др. [578] изучали влияние SDF-1 на мобилизацию в КМ CD34⁺ клеток у мышей NOD/SCID — животной модели кроветворения человека. Было отмечено значительное увеличение миграции CD34⁺ клеток и их разрастания в КМ, которые зависели от экспрессии рецепторов SDF-1 CXCR4. Установили, что SDF-1 стимулировал экспрессию CXCR4 и мог превратить плохо растущую популяцию CD34⁺ клеток в популяцию с повышенным потенциалом роста.

Kim и Broxmeyer [383], изучив хемотаксическую реакцию на SDF-1 и SCF, заключили, что оба фактора действовали синергично в привлечении CD34⁺ клеток кордовой крови и КМ. На основании этого представляется, что сочетанное введение клеток стромы и кроветворных клеток больным миелоаблативным раком может в более выраженной степени способствовать выздоровлению, стимулируя хоуминг CD34⁺ клеток в КМ [181].

Роль ниши в определении судьбы потомков СК остается малоизученной. Возможно образование отдельных коммитированных клеток происходит стохастически, а их последующая пролиферация и направление дифференцировки определяются факторами, которые секретируются различными типами клеток стромы. При этом основная функция факторов ниши — выбирать направление дифференцировки, сохраняя нужные и вызывая апоптоз тех предшественников, которые в данный момент не востребованы. Альтернативно можно предположить о существовании механизмов, с помощью которых факторы, секретируемые стромой КМ, передают информацию стволовой клетке о направлении дифференцировки.

14.2.2. Популяции стволовых клеток стромы костного мозга

В строме костного мозга содержатся, по крайней мере, 5 типов негемопоэтических стволовых клеток. Их названия и фенотип приведены в табл. 14.2. Одни из этих клеток, такие как мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) обнаружены относительно давно и описаны достаточно полно, другие открыты недавно и находятся на стадии изучения. Свойства ЭПК, их способность высвобождаться в периферическую кровь и участвовать в васкуляризации поврежденных органов будут отдельно рассмотрены в последующей главе. В этом разделе мы остановимся на других типах СК и начнем рассмотрение с МСК, несмотря на то, что некоторые их свойства были описаны в главе 2.

Таблица 14.2

Стволовые клетки стромы костного мозга

Тип СК	Фенотип
Мезенхимальные стволовые клетки (МСК)*	CD105 ⁺ , CD90 ⁺ , CD73 ⁺ , CD45 ⁻ , CD34 ⁺ , CD14 ⁻ , CD11b ⁻ , CD79a ⁻ , CD19 ⁻ , HLA-DR ⁻
Multipotent adult progenitor cells (MAPC)*	SSEA-1 ⁺ , CD13 ⁺ , Flk-1 ^{low} , Thy-1 ^{low} , CD34 ⁺ , CD44 ⁻ , CD45 ⁻ , CD117 ⁻ , HLA-DR ⁻
Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells*	CD29 ⁺ , CD63 ⁺ , CD10 ⁺ , CD81 ⁺ , CD122 ⁺ , CD164 ⁺ , c-met ⁺ , BMPR1B ⁺ , NTRK3 ⁺ , CD34 ⁺ , CD36 ⁻ , CD45 ⁻ , CD117 ⁻ , HLA-DR ⁻
Very small embryonic-like stem cells (VSEL)	CXCR4 ⁺ , CD133 ⁺ , CD34 ⁺ , SSEA-4 ⁺ , ИФ ⁺ , c-met ⁺ , LIF-R ⁺ , CD45 ⁻ , CD90 ⁻ , CD29 ⁻ , CD105 ⁻ , HLA-DR ⁻
Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК)	CD133 ⁺ , CD34 ⁺ , CD117 ⁺ , VE-кадгерин ⁺ , VEGFR2 ⁺ , CD146 ⁺ , CD31 ⁺ , фактор Виллебранда ⁺

* фенотип приведен после экспансии in vitro

14.2.2.1. Мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки

МСК человека, выделенные из КМ, морфологически напоминают адгезивные фибробласты. Они представляют очень небольшую фракцию (0,0001 %) общей ядерной популяции КМ, но могут быть размножены, применяя стандартную культуральную методику. Значительный интерес был проявлен к выявлению поверхностных маркеров, специфических для МСК, в результате чего несколько моноклональных антител (Stro-1, SB-10, SH-2, SH-3, SH-4) были получены для характеристики и выделения клеток, обнаруживаемых в строме КМ. Антигены, определяемые этими антителами, были подвергнуты идентификации, применяя методы иммуноосаждения, лазерной десорбции и масс-спектрофотометрию.

Основными функциями МСК КМ в норме являются поддержание гемопоэза, как описано выше, восстановление стромы и содействие регенерации костей после перелома и других соединительных тканей после повреждения. В случае перелома кости МСК надкостницы по обеим сторонам разрыва (твердый каллус) дифференцируются непосредственно в остеобласты. Внутри образовавшегося после перелома пространства костномозговые МСК пролиферируют и дифференцируются в хрящ (мягкий каллус). Затем в хрящ прорастают кровеносные сосуды надкостницы. То же происходит в эмбриогенезе, когда закладывается хрящевая матрица для эндохондральных костей.

Дифференцировка МСК в так называемых ортодоксальных направлениях — в кость, хрящ и жир — подробно описана. Для остеогенной активации необходимо наличие β -глицерофосфата, дексаметазона и СПК. При культивировании в монослое с этими добавками клетки приобретают остеопластическую морфологию с повышением активности ИЦФ и отложением минерализованного экстраклеточного матрикса. Авторы работы [Horwitz, et al., 2002] сообщили о трансплантации цельного КМ для репопуляции остеобластной линии у больных с незавершенным остеогенезом (osteogenesis imperfecta). У 3-х больных после трансплантации было отмечено улучшение плотности и роста кости и обнаружены остеобласты донорского происхождения, участвующие в образовании кости. МСК человека сохраняют *in vitro* потенциал к дифференцировке в остеогенную линию после более 40 делений в культуре, причем этот потенциал сохраняется и после криоконсервирования [Quaini, et al., 2002]. Образование кости синергично повышают bFGF и BMP-2 [414]. Остальные костные морфогенетические белки также играют роль в селективной дифференцировке мезенхимальных предшественников в остеобластическую или адипогенную линии [291]. Блокирование рецепторов BMP-1B обычно приводит к дифференцировке МСК в адипогенную линию. Напротив, повышенная экспрессия рецепторов BMP-1A блокирует липогенную дифференцировку и способствует остеобластической. Таким образом, временная экспрессия или потеря рецепторов BMP может быть ключевым фактором при определении линейной направленности мезенхимальных предшественников в остеобласты или адипоциты [Chen et al., 2003].

Хондрогенная дифференцировка индуцируется, когда МСК культивируются в определенных условиях, включающих: 1) наличие трехпространственного матрикса; 2) безсывороточную питательную среду и 3) добавление TGF- β . В этих условиях клетки быстро теряют свою фибробластоподобную морфологию и начинают экспрессировать много компонентов экстраклеточного матрикса, специфических для хряща. У них отмечается интенсивный биосинтез сульфатированных гликозаминогликанов и происходит резкое изменение клеточной морфологии. TGF- β 1, - β 2 и - β 3 — все имеют способность индуцировать эту реакцию, однако TGF- β 2 и - β 3 более эффективны, чем - β 1 в обеспечении хондрогенеза. Это может быть связано с изобилием этих изоформ в костях и их ролью в образовании каллуса при переломах и заживлении раны. Во время дифференциации в присутствии TGF- β 3 МСК синтезируют связывающий белок агрекан, фибромодулин, олигометрический матриксный белок хряща, декорин, коллаген типа II и хондроадгерин — все компоненты нормального суставного матрикса хряща [Barry et al., 2001]. Предполагают, что версикан, фибромодулин и декорин образуют во время хондрогенеза самые ранние компоненты экстраклеточного матрикса, а агрекан и бигликан

включаются в более поздний период. Как фибромодулин, так и декорин играют роль в регуляции фибриллогенеза коллагена. У мышей, например, фибромодулин экспрессируется во время раннего хондрогенеза конечности, предшествуя образованию полости сустава. Обе молекулы также играют роль в связывании TGF- β , который может влиять на их раннюю экспрессию в процессе сборки матрикса [79].

МСК, культивируемые в монослое в присутствии изобутилметилксантина, становятся адипоцитами с образованием больших вакуолей, наполненных жиром. Адипогенная дифференцировка МСК индуцируется ядерным рецептором и фактором транскрипции PPAR-гамма (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma), так же, как синтазой жирных кислот. Как IL-1, так и TNF- α подавляют липогенез, который опосредуется через NF-kB, активируемый каскадом индукции киназы TAK1/TAB1/NF-kB. В результате подавления этими цитокинами липогенеза происходит прямое переключение дифференциации в остеогенез [Barry et al., 2001].

Популяция МСК КМ гетерогенна и содержит клетки, различающиеся по морфологии и некоторым другим критериям, таким как поверхностные маркеры, особенности роста и пр. [163, 164, 600]. В популяции МСК присутствуют различные по форме и размерам клетки; при этом большие клетки рассматриваются как более зрелые предшественники, а более мелкие — как более ранние МСК, способные к самообновлению. Mets и Verdonk [502] также выделяли среди фибробластоподобных клеток (ФБПК) два типа: большие и плоские клетки обозначались ими как клетки типа II, и более мелкие, веретенообразные были отнесены к типу I. Клетки типа II размножались очень медленно, а клетки типа I — много быстрее.

Colter и др. [163], анализируя МСК в проточном цитофлуориметре с моноклональным антителом к антигену Ki67, специфическому для клеточного цикла, показали, что первичные культуры содержали в качестве основной популяции крупные клетки с умеренной зернистостью, позитивные на Ki67, т. е. находящиеся в клеточном цикле, а также небольшую популяцию более мелких клеток, не содержащих зернистости и не делящихся (Ki67-негативных). На 5-й день культивирования состав клеток изменялся. Около 13 % общей популяции составляли мелкие клетки, не содержащие гранул, которые авторы назвали RS-1. В то же время было отмечено появление новой субпопуляции (до 30 %) мелких гранулированных клеток, находящихся в клеточном цикле (RS-2). В процессе фазы логарифмического роста содержание RS-2 клеток снижалось, что сопровождалось увеличением количества зрелых ФБПК. В последующей работе этих авторов [164] было показано, что активно пролиферирующие RS-2 клетки являются коммитированными клетками-предшественниками, а RS-1 клетки представляют собой субпопуляцию некоммитированных МСК.

В процессе субкультивирования гетерогенность МСК КМ снижается. Так, после двух пассажей (приблизительно 14 клеточных делений) в селективной среде, поддержанной ЭТС, клетки проявляли морфологическую и фенотипическую гомогенность и почти не содержали примеси эндотелиальных клеток, макрофагов или адипоцитов [593].

Предполагают, что среди ФБПК КМ может содержаться несколько разновидностей МСК, различающихся по поверхностным маркерам. По данным Pittenger и др. [593], эти клетки несут маркеры CD44, CD62L, CD90, CD120a и рецепторы TGF β , но не экспрессируют CD14, CD34, CD45, CD49a и рецепторы EGF. Гомогенные ФБПК, о которых сообщали Hung и др. [333], отличаются от клеток, описанных в работе [593] по таким молекулам, как CD49d, CD62L, CD120a и рецепторы TGF β и EGF. Но они также имеют антиген CD90 (Thy-1). В то же время они отличаются от фибробластов КМ, которые всегда остаются положительными на антиген CD34, не несут маркер STRO-1.

Учитывая гетерогенность МСК КМ Международное общество клеточной терапии рекомендовало избегать термин «мезенхимальные стволовые клетки» и использовать вместо него «мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки», сохранив для их обозначения аббревиатуру МСК.

14.2.2.2. Multipotent adult progenitor cells (MAPC)

Из стромы КМ в лаборатории С. М. Verfaillie [Jiang, et al., 2002] выделили популяцию CD45- и гликофорин А-негативных клеток, обладающих адгезивными свойствами и морфологией, характерной для МСК. Однако, в отличие от МСК, которые преимущественно ограничены образованием только мезодермальных линий, эти клетки были способны дифференцироваться *in vitro* не только в мезодермальные производные, но также *in vivo* в клетки нейроэктодермы (примитивные нейральные и глиальные клетки) и *in vitro* — в гепатоцитоподобные клетки эндодермы. Они получили название multipotent adult progenitor cells (MAPC). Свойства MAPC описаны в ряде работ [358, 359, 631–633]; они могут содержаться в культуре в экспоненциальной фазе роста в течение значительного времени (не менее 100 популяционных удвоений) без трансформации, сохраняя стабильный фенотип (табл.14.3).

Особого внимания заслуживает работа, в которой продемонстрирована способность MAPC к образованию функционально активных гепатоцитов [669]. MAPC, изолированные из КМ человека, крыс и мышей, культивировали на матриксе в присутствии FGF-4 и HGF. Через 7 дней культивирования клетки экспрессировали маркеры бипотентных гепатобластов *hepatocyte nuclear factor-3 β* (HNF-3 β), GATA4, цитокератин 19 (CK19) и α -фетопротеин. Через 3 недели они экспрессировали маркеры зрелых гепатоцитов, такие как CK18, HNF-4, and HNF-1 α , альбумин. При этом 25 % клеток, полученных из КМ человека, были двуядерными, секретировали мочевины и альбумин, запасали гликоген и синтезировали цитохром Р-450 в ответ на индукцию фенobarбиталом.

Более того, после инъекции в бластоцисту MAPC вовлекались в ее развитие, образуя клетки всех трех зародышевых листков [Jiang, et al., 2002], что свидетельствует о плюрипотентности этих клеток. Плюрипотентность MAPC нужно еще подтвердить исследованиями в независимой лаборатории, особенно учитывая результаты Meirelles и Nardi [497], которые, культивируя МСК, полученные по обычному протоколу, в условиях, рекомендованных для выращивания MAPC, наблюдали появление иммунофенотипических свойств, характерных для MAPC.

14.2.2.3. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells

Эта популяция клеток была выделена из мононуклеаров КМ при культивировании на фибронектине в условиях низкого парциального давления кислорода (3–5 % вместо обычно используемого воздуха, в котором содержится 21 % кислорода) и низкой концентрации ЭС (2 %) [D'Ippolito, et al., 2004]. Еще одной особенностью выделения этих клеток, названных авторами клетками MIAMI, было сокультивирование адгезивных и неадгезивных клеток первичной суспензии КМ в течение первых 14 дней. Возможно, благодаря выделению цитокинов и ростовых факторов неадгезивные клетки поддерживали небольшую фракцию примитивных клеток, что обеспечивало не только их выживание в жестких условиях культуры, но и пролиферацию с образованием колоний мелких адгезивных клеток. MIAMI клетки были выделены из КМ людей возраста от 3 до 72 лет. Причем, колониеобразующая активность снижалась с возрастом, что свидетельствует об истощении пула клеток MIAMI при старении. Однако дифференцировочный потенциал этих клеток, выделенных даже из лиц наиболее преклонного возраста, сохранялся.

Клетки изолированных адгезивных колоний после экспансии представляли собой гомогенную популяцию и экспрессировали CD29, CD63, CD81, CD122, CD164, рецептор HGF (сMet), рецептор 1В BMGP (BMGP1B), рецептор 3 нейротрофической тирозинкиназы (NTRK3) и были негативны на CD34, CD36, CD45, CD117 (сKit) и HLA-DR. По экспрессии поверхностных маркеров клетки MIAMI отличались от других стромальных СК, таких как RS-1 и MAPC. Например, клетки MIAMI экспрессировали CD10 (нейтральную пептидазу примитивных В-клеток герминального центра), а RS-1 и MAPC — нет. В отличие от RS-1 и MAPC клетки MIAMI экспрессировали CD164 (сиаломуциноподобную молекулу, найденную на ранних гемопоэтических предшественниках), а также молекулы, участвующие в сигнальной трансдукции различных типов клеток (CD81, CD122, сMet,

BMPR1B. Кроме того, во всех культурах клеток MIAMI определялись маркеры плюрипотентности Oct-4 и Rex-1, а также высокие уровни теломеразы.

Подобно MCK, RS-1 или MAPC клетки MIAMI обладали способностью к индуцированной дифференцировке *in vitro* в остеогенном, адипогенном, хондрогенном направлениях, а также в клетки, обладающие свойствами ранних нейрональных предшественников. Однако в отличие от других СК стромы клетки MIAMI в условиях индукции образовывали малоадгезивные сферические кластеры, которые экспрессировали маркеры клеток эндодермального происхождения, в частности, клеток островков поджелудочной железы.

14.2.2.4. Very small embryonic-like stem (VSEL) cells

Недавно была обнаружена гомогенная популяция редких Sca-1⁺ lin-CD45⁻ клеток, содержание которых в костном мозге мышей составляло около 0,01 % ядерных клеток. Эти клетки экспрессировали маркеры плюрипотентности, такие как SSEA-1, Oct-3/4, Nanog, Rex-1 и Rif-1 — белок, контролирующий элонгацию теломеров [Kucia, et al., 2006]. Эти клетки оказались очень мелкими, их размер при прямом определении в электронном микроскопе составлял всего 2–4 мкм в диаметре. Несмотря на маленькие размеры клетки имели двойной набор хромосом и содержали довольно большое количество митохондрий. Было обнаружено, что они обладают некоторыми свойствами эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), например, большим ядром, окруженным узким ободком цитоплазмы, и открытым типом хроматина. В связи с этим авторы их называли «очень мелкими эмбриональноподобными» (VSEL) клетками. Клетки VSEL не экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости класса 1 и 2, а также CD90, CD105, CD29 — маркеры MCK.

Интересно отметить, что такая редкая популяция как клетки VSEL тоже не совсем однородна. При помещении на фидерный слой из клеток саркомы мыши только 5–10 % очищенных VSEL формировали сфероиды, похожие на эмбрионидные тельца. Клетки, входящие в состав этих сфероидов, имели большое ядро, содержали эухроматин и, также как и очищенные VSEL, экспрессировали SSEA-1, Oct-3/4 и CXCR4. При пересеве клеток сфероидов на такой же фидерный слой они в течение 5–7 пассажей были способны образовывать новые сфероиды, а при переводе в дифференцировочные среды развивались в клетки всех трех зародышевых листков. В качестве доказательства того, что сфероиды образуются именно из клеток VSEL, а не из клеток фидера, были проведены эксперименты, в которых на фидерный слой помещали клетки VSEL, выделенные из GFP-позитивных мышей. Все вновь образованные сфероиды полностью состояли из GFP⁺-клеток. Этот факт свидетельствует о том, что сфероиды образуются исключительно из клеток VSEL, а также исключает возможность слияния VSEL и клеток фидера. Еще одной особенностью клеток VSEL является то, что они способны образовывать сфероиды только в том случае, если были выделены из молодых мышей. При культивировании на том же фидере клеток VSEL, изолированных из мышей старше 2 лет, сфероиды не образовывались. Была обнаружена также разница в содержании VSEL в КМ долгоживущих и короткоживущих линий мышей.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что клетки VSEL, MIAMI, MCK или MAPC не идентичны, хотя они, возможно, связаны друг с другом в развитии гетерогенной стромальной системы. Вместе с тем, различные условия выделения и экспансии, играющие значительную роль в проявлении выявляемых свойств, могут существенным образом влиять на характеристики и взаимоотношение этих типов клеток.

14.2.3. Критерии стандартизации препаратов MCK человека

Научный и клинический интерес к MCK человека резко возрос в последние два десятилетия, однако вопрос стандартизации получаемых препаратов был поднят относительно недавно. Необходимость стандартизации обусловлена тем, что методы выделения и экспансии MCK, используемые в различных лабораториях, отличаются между собой, и порой существенно. Кроме того, клетки со свойствами MCK выделены из различных тканей, а эквивалентность их примене-

ния в экспериментальных исследованиях и клеточной терапии затруднен в связи с отсутствием стандартных критериев оценки. В связи с этим комитет Международного общества клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy, ISCT) предложил для обозначения адгезивных к пластику клеток со свойствами мезенхимальных стволовых клеток, независимо от источника их получения, использовать термин «мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки», сохранив аббревиатуру МСК [209, 327]. При этом термин «мезенхимальные стволовые клетки» рекомендовано применять только в тех исследованиях, в которых подтверждаются стволовые свойства использованных клеток. Было предложено три минимальных критерия для определения МСК: 1) адгезия к пластику; 2) экспрессия специфических антигенов; 3) способность в стандартных условиях *in vitro* к трехлинейной мезенхимальной дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондробласты.

Более 95 % клеток в популяции МСК должны при измерении методом проточной цитометрии экспрессировать CD105 (эндоглин, выявляемый моноклональным антителом SH2), CD73 (экто 5' нуклеотидаза, выявляемая моноклональными антителами SH3 и SH4), и CD90 (антиген, также известный как Thy-1). МСК не должны экспрессировать (менее 2 % положительных тестов) CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79α или CD19 и HLA класса II. Молекулы HLA-DR не должны экспрессироваться на МСК до тех пор, пока эти клетки не стимулированы, например, IFN-γ. Таким образом, панель антигенов, которые не должны выявляться на МСК, включает: CD45 — панлейкоцитарный маркер; CD34 — антиген, который маркирует примитивные гематопозитические прогениторные и эндотелиальные клетки; CD79α и CD19 — маркеры В клеток; антигены CD14 и CD11b, которые экспрессируются на моноцитах и макрофагах. Из двух макрофагальных и двух В-клеточных маркеров исследователям достаточно протестировать изучаемую культуру только по одному маркеру.

Описанные критерии могут применяться только для стандартизации МСК человека. Хотя адгезивные свойства и трехлинейная дифференцировка характерны также для клеток других видов млекопитающих, например, МСК мышей, экспрессия поверхностных антигенов изучена в этих системах неполно и поэтому не может рекомендоваться для характеристики МСК. Авторы проекта справедливо полагают, что разработанные критерии станут основой для более точной характеристики МСК, а их принятие позволит сравнить и стандартизировать клеточные препараты, полученные в различных лабораториях, что, в свою очередь, ускорит доклинические испытания МСК и их внедрение в клиническую медицину.

14.2.4. Терапевтический потенциал мезенхимальных стромальных клеток костного мозга

В связи со способностью к самообновлению и превращению во многие типы тканей уже на основании первых работ с МСК у этих клеток стали предполагать наличие терапевтического потенциала. При трансплантации в плод овцы МСК КМ взрослого человека приживались во всех органах плода и дифференцировались в тканеспецифические линии клеток [455]. При совместной трансплантации с кроветворными клетками донора МСК повышали приживание ГСК [62; Almeida-Porada, et al., 1999]. Сообщали об успешном применении МСК в клинике для восстановления микроокружения КМ после миелоаблативной терапии [392; Кос, Lazarus, 2001]. У иммунодефицитных мышей наблюдали миграцию МСК человека в зоны мышечной дегенерации, в которых эти клетки подвергались миогенной дифференцировке [775]. Также было показано, что у детей с недостаточностью остеогенеза, обусловленной дефектом коллагена типа I, трансплантация аллогенного КМ вызывала приживание донорских клеток, обеспечивающих повышение плотности кости [Horwitz, et al., 2002]. Были проведены испытания на животных и в клинике применения МСК для лечения переломов кости и повреждений сухожилий, регенерации хряща и поддержания приживания клеток после химиотерапии [589, 700]. Предположили, что полный геном этих клеток обладает потенциалом для превращения в любой тип клеток.

Далее было установлено, что при эктопической трансплантации КМ микроокружение, создаваемое линейными клетками стромы, благоприятствует развитию кроветворной ткани. Локальная трансплантация клеток стромы КМ позволяла провести эффективную реконструкцию больших дефектов кости. На животных моделях убедительно была показана эффективность пересадки клеток стромы КМ для ортопедических целей [367, 404], определены условия экспансии, состав и структура идеального носителя клеток и установлено количество клеток, необходимое для регенерации определенного объема кости. Применение трансплантации клеток стромы стали рассматривать как перспективный метод лечения генерализованных заболеваний скелета. Образование хряща клетками стромы также стало темой многих публикаций [Johnstone, et al., 1998; Fortier, et al., 1998]. У собак, получивших после однократной дозы летального облучения трансплантацию аутологичных прогениторных клеток периферической крови, стимулированных G-CSF, а также размноженных *ex vivo* МСК, трансдуцированных трансгеном зеленого флуоресцентного белка (GFP), отметили быстрое восстановление кроветворения с обнаружением GFP-позитивных клеток в течение 6 месяцев после трансплантации [520]. Остеобласты, выделенные из длинных костей мыши и трансплантированные аллогенным мышам в сочетании с тщательно подобранными МСК КМ, способствовали более активному приживлению трансплантата в аллогенной окружающей среде [389]. Аутоиммунным мышам (MPL/MP-lpr/lpr), подвергнутым аллогенной трансплантации КМ, одновременно подсаживали донорскую косточку в качестве источника клеток стромы [340]. Мыши прожили после трансплантации 48 недель без рецидива аутоиммунного заболевания. Авторы предположили, что клетки стромы не только предупреждают развитие недостаточности трансплантата, но еще играют роль в сложной иммунорегуляции Т и В клеток. В настоящее время известно, что даже при экспрессии на МСК молекул HLA класса I или молекул HLA класса II, реагирующих на IFN- γ , аллогенная ответная реакция *in vitro* не развивается и МСК не вызывают острого отторжения *in vivo* [198, 421, 433, 434, 647]. В результате работы многих исследовательских коллективов было установлено, что МСК из КМ человека представляют полезную, легко получаемую и хорошо охарактеризованную популяцию для регенерации мезенхимальной ткани. Эти клетки могут использоваться в аллогенном организме и доза их в пределах 50×10^6 клеток на человека переносится хорошо и давно признана безопасной [431]. На основании экспериментов *in vitro* с лимфоцитами от неродственных доноров было заключено, что МСК человека не вызывают пролиферацию Т клеток и могут активно подавлять смешанную реакцию лимфоцитов, подтверждая возможность применения МСК в аллогенном организме [38].

В экспериментальных работах на препаратах МСК фетального происхождения показано, что они проявляют низкую иммуногенность и высокую активность [33] — эффективнее размножаются и значительно позже стареют в культуре, чем их аналоги из клеток взрослых. Клетки стромы КМ плодов характеризуются более высокими уровнями цитокинов, необходимых для приживания и хоуминга трансплантируемых СК. При сравнительном изучении пролиферативных и остеогенных потенциалов МСК из КМ и пуповины плодов человека и МСК из жировой ткани и КМ взрослых было установлено [Zhang, et al., 2008], что только МСК фетального происхождения экспрессируют эмбриональные маркеры плюрипотентности Oct-4 и Nanog. МСК из КМ плодов имели самую высокую колониеобразующую способность (CFU-F), самое короткое время удвоения (32 против 54–111 часов), самые высокие уровни маркера Stro-1 и самую низкую степень экспрессии антигенов HLA-1. Через 2 месяца после имплантации иммунодефицитным мышам носителей с клетками наиболее надежную минерализацию обеспечивали МСК из КМ плодов человека.

Несмотря на всю привлекательность МСК человека для клинического применения, отдельные авторы выделяют целый ряд вопросов, которые в отношении этих клеток остаются еще неразрешенными. В частности, Владимирская Е. Б. и др. [4] считают, что остаются без ответа «фундаментальные вопросы относительно существования фенотипа и функции МСК *in vivo*. Происхождение в процессе развития и партнеры МСК взрослого происхождения не идентифи-

цированы, также как не очерчены взаимоотношения МСК с другими типами СК». Эти авторы склонны думать, что «взаимоотношения между МСК и живущими в тканях СК остаются недоказанными». Чуть ли не единственной работой, в которой показано включение МСК-подобных клеток в нормальное обеспечение жизнедеятельности массива ткани, они называют исследование Vonyadi и др. [112], проведенное на трансгенных мышях Sca-1/Ly-6A null. В этой работе было показано развитие остеопороза у мышей с нормальным скелетным развитием, но с дефектом самообновления мезенхимальных предшественников. Владимирская Е. Б. и соавторы отмечают, что «оптимизация терапевтического применения МСК требует современных подходов, которые простираются вне относительно простой экспансии трансплантационных методик, применяемых в настоящее время». Как добиться преобладания самообновления над дифференцировкой в культурах *in vitro* и обеспечить высокий уровень хоуминга и приживления во время экспансии МСК? Необходимо выяснение условий функциональной дифференцировки этих клеток и роли специфических сигналов, необходимых для их линейной спецификации. Только тогда «терапевтическое обещание этой завораживающей клеточной популяции может быть полностью реализовано» [4].

Обширную информацию о терапевтическом потенциале клеток костного мозга читатель может почерпнуть из недавно вышедшей монографии «Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций», подготовленную авторским коллективом ФГУ НИИТ и ИО Росздрава под редакцией Шумакова В. И., Онищенко Н. А. В монографии представлены результаты собственных исследований авторов по экспериментальному и клиническому применению клеток костного мозга для коррекции тяжелых дисфункций различных органов и тканей. При этом авторы отмечают, что и в эксперименте, и в клинике улучшение функции поврежденных органов и тканей после трансплантации клеток-предшественников КМ сопровождается активацией входящих в их состав клеток: кардиомиоцитов при сердечной недостаточности; островковых клеток поджелудочной железы при сахарном диабете I типа; активизируются процессы заживления ожоговых ран и язвенных дефектов при моделировании хронических язв желудка; ускоряются процессы консолидации длинных трубчатых костей при резекциях пораженных участков, повышается плотность костной ткани при парадонтите и пр. Корректирующее действие клеток костного мозга авторы объясняют как местными, так и системными механизмами, способными индуцировать регенерацию в поврежденных органах и восстановить их функцию.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций /Под ред. Шумакова В. И., Онищенко Н. А. — Москва: Лавр, 2009. — 308 с.

Almeida-Porada G., Flake A. W., Glimp H. A., et al. Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero // Exp. Hematol. — 1999. — Vol. 27. — P. 1569–1575.

Archimbaud E. Immune reconstitution following transplantation of selected hematopoietic stem cell // Hematol. Cell Ther. — 1997. — Vol. 39. — P. 264–268.

Azizi S. A., Stokes D., Augelli B. J., et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats: similarities to astrocyte grafts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 3908–3913.

Baines P., Visser J. W. Analysis and separation of murine bone marrow stem cells by H 33342 fluorescence activated cell sorting // Exp. Hematol. — 1983. — Vol. 11. — P. 701–708.

Barry F., Boynton R. E., Liu B., et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components // Exp. Cell Res. — 2001. — Vol. 268. — P. 189–200.

Bertoncello I., Bradely T. R., Hodgson G. S. Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I) The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen of the basis of Rhodamine-123 fluorescence // Exp. Hematol. — 1985. — Vol. 13. — P. 999–1006.

Bouscary D., Lacombe C., Dreyfus F., et al. The CD34⁺ Thy⁺ cell population: are they all stem cells? // Exp. Hematol. — 2000. — Vol. 28. — P. 1312–1314.

Bradford G.B., Willias B., Rossi R., et al. Quiescence, cycling and turnover in the primitive HPSC compartment marrow and spleen of the basis of Rhodamine-123 fluorescence // Exp. Hematol. — 2004. — Vol. 32, Suppl 1. — P. 34.

Castro R.F., Jackson K.A., Goodell M.A., et al. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo // Science. — 2002. — Vol. 297. — P. 1299.

Chen D., Ji X., Harris V.A., et al. Differential roles for bone marrow morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages // J. Cell. Biol. — 1998. — Vol. 142. — P. 295–305.

Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M., et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 3213–3218.

Fortier L.A., Nixon A.J., Williams J., et al. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Am. J. Vet. Res. — 1998. — Vol. 59. — P. 1182–1184.

Goodell M.A., Rosenzweig M., Kim H., et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species // Nat. Med. — 1997. — Vol. 3. — P. 1337–1345.

Habibian H.K., Peters S.O., Hsieh C.C., et al. The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit // J. Exp. Med. — 1998. — Vol. 188. — P. 393–398.

Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 8937–8938.

Huss R., Gatsios P., Graeve L., et al. Quiescence of CD34⁺ negative haematopoietic stem cells is mediated by downregulation of cyclin B and no STAT activation // Cytokine. — 2000. — Vol. 12. — P. 1195–1204.

Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells // Exp. Cell Res. — 1998. — Vol. 238. — P. 265–272.

Koc O.N., Lasarus H.M. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic // Bone Marrow Transplant. — 2001. — Vol. 27. — P. 235–239.

Kucia M., Reza R., Campbell F.R., et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺SSEA-1⁺Oct-4⁺ stem cells identified in adult bone marrow // Leukemia. — 2006. — Vol. 20. P. 857–869.

Lambert J.F., Liu M., Colvin G.A., et al. Intrinsic hematopoietic stem cell/progenitor plasticity in vivo // J. Exp. Med. — 2003. — Vol. 197. — P. 1563–1572.

Lange C., Kaltz C., Thalmeier K., et al. Hematopoietic reconstitution of syngeneic mice with a peripheral blood-derived, monoclonal CD34⁺, Sca-1⁺, Thy-1^{low}, c-kit⁺ stem cell line // J. Hematother. Stem Cell Res. — 1999. — Vol. 8. — P. 335.

Loges S., Fehse B., Brockmann M.A., et al. Identification of the adult human hemangioblast // Stem Cells Dev. — 2004. — Vol. 13, 3. — P. 229–242.

Marone M., De Ritis D., Bonanno G., et al. Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation // Leuk. Lymphoma. — 2002. — Vol. 43. — P. 51–57.

Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., et al. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes in myocardial infarcts // Nature. — 2004. — Vol. 428. — P. 664–668.

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // Nature. — 2001. — Vol. 410. — P. 701–705.

Osawa M., Hanada K., Hamada H., et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34⁺ low/negative hematopoietic stem cell // Science. — 1996. — Vol. 273. — P. 242–245.

Padovan C.S., Jahn K., Birnbaum T., et al. Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133⁺ stemlike cells // Cell Transplant. — 2003. — Vol. 12. — P. 839–848.

- Pang W., Mahmud N., Rose D., et al.* Identification of neighborhoods of genes expressed by hematopoietic stem cells // *Exp. Hematol.* — 2004. — Vol. 32, Suppl. 1. — P. 32–34.
- Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells // *Science.* — 1999. — Vol. 284 — P. 1168–1170.
- Quaini F., Urbanek K., Beltrami A.P., et al.* Chimerism of the transplanted heart // *N. Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 346. — P. 5–15.
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Machalinski B., Kucia M.* Bone-marrow-derived stem cells — our key to longevity? // *J. Appl. Genet.* — 2007. — Vol. 48, 4. — P. 307–319.
- Tarasov A.I., Petrenko A.Y., Jones D.R.* The osmotic characteristics of human fetal liver-derived hematopoietic stem cell candidates // *Cryobiology.* — 2004. — Vol. 48, 3. P. 333–340.
- Uchida N., Tsukamoto A., He D., et al.* High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 101. — P. 961–966.
- Zannettino A.C., Buhring J.H., Niutta S., et al.* The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis // *Blood.* — 1998. — Vol. 92. — P. 2613–2628.
- Zhang Z.Y., Teoh S.H., Chong M.S., et al.* Superior Osteogenic Capacity for Bone Tissue Engineering of Fetal Compared To Perinatal and Adult Mesenchymal Stem Cells // *Stem Cells.* — 2008. — Vol. 27, 1. — P. 126–137.

ГЛАВА 15. ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ

15.1. Свойства эндотелиальных прогениторных клеток

Эндотелиальные стволовые клетки или, как их чаще называют в специальной литературе, эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) представляют собой уникальную популяцию мононуклеарных клеток костного мозга. Возможно, они проявляют более низкую пластичность и способность к самообновлению, чем, например, ГСК или МСК, однако сохраняют способность дифференцироваться в несколько типов клеток. В частности, при сокультивировании с кардиомиоцитами новорожденных крыс ЭПК дифференцируются в кардиомиоциты [Iwami, et al., 2004]. Обычно ЭПК дифференцируются в зрелые эндотелиальные клетки (ЭК). ЭК являются патогенетическим звеном многих ангиогенных заболеваний, таких как полиартрит, псориаз, эндометриоз, диабетическая ретинопатия и др., а также обеспечивают васкуляризацию опухолей. ЭК служат центральным элементом ангиогенеза, который *in vivo* регулируется также рядом поддерживающих клеток, таких как перициты, клетки гладких мышц, фибробласты. Влияние на ангиогенез оказывают также форменные элементы циркулирующей крови, а также присущие ей механические свойства.

ЭПК и зрелые ЭК экспрессируют сходные маркеры, хотя уровни экспрессии, определяемые иммуногистохимически и Вестерн-блот анализом, у них разные. Общие маркеры включают: CD34, VEGFR2, Tie-2, васкулярно-эндотелиальный (VE)-кадгерин, CD146, CD31 (PECAM) фактор Виллебранда и VEGFR2 [Hristov, Weber, 2004; Iwami, et al., 2004; Khakoo, Finkel, 2005]. Примитивные ЭПК экспрессируют CD133, CD34, Flk-1 и VEGFR2 [49], в то время как зрелые ЭК негативны на CD133, CD34, но экспрессируют более высокие уровни CD31, фактор Виллебранда, VEGFR2 и VE-кадгерин [657]. CD133-позитивные клетки проявляют более выраженную способность дифференцироваться в ЭК, чем CD34⁺ клетки и, таким образом, ранняя экспрессия CD31 на культивированных CD133-позитивных клетках в ходе дифференцировки может служить показателем принадлежности этих клеток к ЭКП.

Исследование *in vitro* и *in vivo* эндотелиальной активности и ангиогенного потенциала ЭПК было проведено на мышцах линии RM 26. При культивировании ЭПК периферической крови обнаружили высокий уровень экспрессии PECAM (CD31) и рецепторов VEGF (VEGF-R1) [Conrad, Huss, 2005]. После индукции экспрессии ангиогенных факторов транскрипции клетки образовывали на матриксе из коллагена типа I структуры, подобные эндотелию. После внутривенного введения ЭПК RM26 мышам с моделированной ишемией у всех животных отмечалось значительное улучшение относительного потока крови с образованием коллатеральных сосудов [Conrad, Huss, 2005]. Авторы заключили, что ЭПК обладают способностью поддерживать васкулогенез под влиянием таких стимулов окружающей среды, как клеточный стресс или ишемия, вызванная гипоксией.

Из периферической крови человека по реакции с моноклональными антителами к антигенам CD34 и Flk также были выделены прогениторные клетки, способные к дифференцировке *in vitro* в эндотелиальные клетки. Было продемонстрировано, что эти клетки, соответствующим образом маркированные, включались у животных в эндотелий капилляров, реагирующих на ишемию, вызванную удалением участка бедренной артерии [52].

С использованием рецепторов-2 VEGF и антигенов CD34 или CD133 циркулирующие ЭПК были выделены из мононуклеарных клеток периферической крови [65, 683, 562, Peichev, et al., 2000, Yin, et al., 1997]. *In vitro* эти клетки дифференцировались в эндотелиальные клетки, а *in vivo* — перемещались в места ишемии, где содействовали неоваскуляризации или включались в новообразованные сосуды [65]. Было показано, что ЭПК могут быстро размножаться в культуре, содержащей VEGF-A [Yamaguchi, et al., 2003]. У крыс *nude* с модельной ишемией трансплантация ЭПК, дифференцированных в эндотелий, способствовала неоваскуляризации и содействовала поддержанию функции левого желудочка сердца [375].

ЭПК выращивали из популяций CD34⁺ и CD133⁺ клеток крови, очищенных от CD14⁺ моноцитов или суммарной фракции мононуклеаров. Культивированные ЭПК, полученные из разных стар-

товых популяций, экспрессировали эндотелиальные маркерные белки: фактор Виллебранда VIII, рецепторы 2 VEGF, VE-кадгерин, CD 146, CD 31 и eNOS [65; Gehling, et al., 2000; Kalka, et al., 2000]. Эти клетки характеризовались способностью к образованию колоний эндотелиальных клеток и улучшению неоваскуляризации у животных с ишемией задней конечности и инфарктом миокарда [Kalka, et al., 2000; Tomita, et al., 1999; Urbich, Dimmeler, 2004; 345, 375, 392, 394, 562]. Значительное улучшение потока крови при хронической ишемии конечностей было установлено также после трансплантации клеток стромы аутологичного КМ [Al-Khalidi, et al., 2003]. Совокупность приведенных данных свидетельствует о том, что ЭПК обеспечивают постнатальный васкулогенез при заживлении ран, регенерации органов и тканей после нарушения проходимости сосудов в случае ишемии конечностей, инфаркта миокарда, осложнения атеросклероза и др.

В ответ на повреждение ЭПК быстро высвобождаются в периферическую кровь. Данные о количестве клеток костномозгового происхождения, включающихся в новообразованные капилляры, варьируют. Если в одних работах показано, что до 50 % клеток новообразованных капилляров происходят из клеток КМ, в других работах включение циркулирующих клеток в эндотелиальное покрытие вообще не могли обнаружить [Urbich, Dimmeler, 2004.]. Эти различия могут быть вызваны неодинаковыми условиями опытов (разные линии мышей, неодинаковая степень или разный характер повреждения и т. д.). Если полагаться на результаты работы [724], в которой исследовали динамику содержания ЭПК в периферической крови в ответ на ишемическое повреждение и индукцию цитокинами, то их количество достигает 12 % общего количества мононуклеарных клеток. Интересно отметить, что во всех работах, независимо от степени включения клеток, отмечается значительное улучшение неоваскуляризации после введения различных популяций прогениторных клеток.

15.2. Роль эндотелиальных прогениторных клеток в морфогенезе кровеносных сосудов

Морфогенез васкулатуры плода начинается со спецификации предшественников эндотелиальных клеток — ангиобластов, которые имеют единого с ГСК предшественника, называемого гемангиобластом. Это мнение основано на том, что ЭПК и ГСК обладают многими общими детерминантами, такими как CD34, CD133, Scf-1, c-Kit, Tie-2 и Flk-1 [Hristov, Weber, 2004; Iwami et al., 2004; Khakoo, Finkel, 2005]. В сосудистом русле ЭПК экспрессируют уже маркеры эндотелиальной принадлежности, включая фактор Виллебранда и VE-кадгерин [Hristov, Weber, 2004]. При образовании сосудов во время эмбриогенеза ангиобласты начинают экспрессировать один из рецепторов VEGF — Flk-1 и превращаются в ЭПК, которые объединяются в сосудобразные пряди и, дифференцируясь в эндотелиальные клетки, собираются в капилляры. Из этих образований закладывается сосудистая сеть, вокруг которой начинают группироваться мезенхимальные клетки, формируя стенки сосудов. Клетки, составляющие стенки сосудов — муральные клетки (перициты, клетки гладких мышц) происходят из мезодермы, клеток нейрального гребня или эпикарда, мигрирующих, чтобы принять участие в образовании сосудов [Wartenberg, et al., 2006]. *In vivo* взаимодействие между эндотелиальными и муральными клетками имеет существенное значение для развития сосудов и поддержания их роста. Установлено, что у плода в эндотелиальном покрытии сосудов локализовано большое количество мультипотентных ГСК, образующих предшественники кроветворных клеток [Rosenthal, 2003.]. Позднее они оказываются в КМ, который становится главным местом кроветворения.

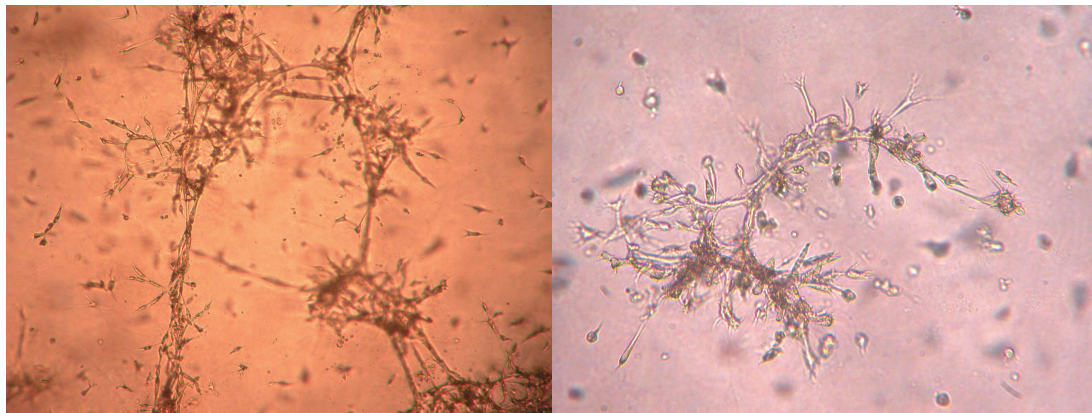
В регенерирующей ткани постнатального человека ЭПК оказываются постоянными участниками образования новых кровеносных сосудов и, в случае экспериментального повреждения, могут индуцировать неоангиогенез и способствовать неоваскуляризации [345, 394, 662]. Небольшая часть стромальных клеток КМ синтезирует антиген, ассоциирующийся с фактором Виллебранда VIII — маркером эндотелиальных клеток, а среди клеток капилляров с помощью моноклонального антитела S2 можно обнаружить клетки, экспрессирующие не только фактор Виллебранда VIII, но и другой маркер эндотелия UA1 [631].

У взрослого человека образование кровеносных сосудов может происходить путем ангиогенеза, ангиогенеза или васкулогенеза [Carmeliet, 2000]. Артериогенезом называют рост коллатеральных сосудов из предсуществующих артериол-анастомозов, тогда как ангиогенез представляет собой образование новых капилляров путем отщепления зрелых эндотелиальных клеток от предсуществующих сосудов с последующей миграцией и пролиферацией зрелых эндотелиальных клеток. При васкулогенезе образование новых кровеносных сосудов происходит главным образом путем мобилизации из костного мозга ЭПК, которые проникают в места ишемии и осуществляют постнатальную неоваскуляризацию [Carmeliet, 2000].

Исследования Majka, et. al. [Majka, et al., 2003] показали, что из КМ происходят как ГСК, так и эндотелиальный и гладкомышечный компоненты сосудов. Авторы подвергли анализу клетки, выделенные из скелетных мышц взрослого человека. Было установлено, что клетки, оказавшиеся в боковой популяции (Side population, SP), экспрессировали маркеры ГСК и прогениторных клеток сосудистого эндотелия (Sca-1, CD34⁺/CD45⁻). Клетки, не попавшие в SP, экспрессировали гены, типичные для предшественников гладкомышечных клеток. После введения обеих популяций в мышцы беспородных мышей, поврежденные токсином, установили, что клетки SP пополняли эндотелиальный компонент неоваскулятуры, тогда как не-SP клетки обнаруживались только среди клеток гладких мышц. Предварительно было установлено, что клетки SP, являясь большей частью ГСК, могут реконструировать КМ летально облученных животных [345]. Таким образом, ЭПК костномозгового происхождения, находящиеся в скелетных мышцах взрослого человека, способны в соответствующем микроокружении и при действии повреждающего фактора образовать субпопуляции, пополняющие как эндотелиальный, так и гладкомышечный компоненты новообразованных кровеносных сосудов.

Lin и др. [Lin, et al., 2000] исследовали циркулирующие ЭПК у 6 реципиентов трансплантатов КМ от доноров противоположного пола. Трансплантаты были пересажены за 5–20 месяцев до начала исследования. Было установлено, что в первых пробах периферической крови трансплантатов большая часть эндотелиальных клеток имела генотип реципиента, но через месяц преобладали уже клетки с донорским генотипом. Авторы предположили, что эти клетки происходят из циркулирующих ЭПК. На животных с экспериментальной ишемией были проведены исследования, показавшие, что СПК, происходящие из периферической крови человека, включаются в активный ангиогенез. Так, при изучении роста эндотелия пересаженных сегментов аорты в условиях, исключающих возможность отторжения, установили, что до 10 % клеток эндотелия происходят от хозяина. Таким образом, повреждение ткани является активным стимулом для разрастания циркулирующих клеток [Williams, 1971]. В другой работе на крысах с ишемическим инфарктом миокарда установили, что в репаративном процессе могут участвовать CD 34⁺ клетки взрослого человека, мобилизованные из периферической крови обработкой G-CSF. После внутривенной инъекции клеток человека крысам наблюдали образование новых человеческих капилляров в основном в результате пролиферации СПК внутри зоны инфаркта [394]. Еще в одной работе обнаружили, что после введения крысам с инфарктом миокарда в зону поражения высоко очищенных Lin⁻/c-kit⁺ клеток костного мозга сингенных крыс образуются, кроме кардиомиоцитов и клеток гладких мышц, новые эндотелиальные клетки [561].

Процессы ангиогенеза на культуре эндотелиальных клеток изучаются обычно с применением биodeградирующих носителей, например, «Matrigel», поддерживающих компоненты экстраклеточного матрикса или в культуральных чашках, покрытых коллагеном и/или фибрином. В этих условиях образование капилляроподобных структур начинается уже через 24 ч. после начала культивирования [657, Wartenberg, et al; 2006]. В нашей лабораторной работе мы наблюдали образование капилляроподобных структур (рис. 15.1) при культивировании в «эндотелиальной» ростовой среде EGM-2, содержащей VEGF, МСК жировой ткани и стромальных клеток фетальной печени на Matrigel.



А

Б

Рис. 15.1. Формирование капилляроподобных структур МСК жировой ткани (А) и стромальных клеток фетальной печени человека (Б) в Matrigel после 14 суток культивирования в среде EGM-2 (ув. X 100)

15.3. Роль ангиогенных факторов в неоваскуляризации

Kinnaird и др. [Kinnaird, et al., 2004] показали, что КМ мышей, лишенный $CD34^+$ и $CD45^+$ клеток и введенный мышам *in situ* через 24 ч. после односторонней ишемии задней конечности, улучшает функцию конечности, несмотря на незначительное приживание долгоживущих клеток. Авторы обнаружили, что животные, получившие после повреждения клеточную взвесь, содержали маркированные донорские клетки, окруженные $bFGF^+$ и $VEGF^+$ клетками. Таким образом, было установлено, что факторы, секретируемые МСК ($bFGF$, $VEGF$, $PLGF$ и $MCP-1$ — monocyte chemoattractant protein-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок-1) имеют значительную роль в восстановлении конечности. Интересно, что $MCP-1$, секретируемый клетками, находящимися в стенке сосудов, способен мобилизовать циркулирующие моноциты к дифференцировке в эндотелиальные клетки [Fujiyama, et al., 2003]. К этому можно добавить, что в ряде работ было отмечено значительное улучшение потока крови после трансплантации клеток стромы аутологичного КМ при хронической ишемии конечности [Al-Khaldi, et al., 2003].

У клонов СК, выделенных из периферической крови и КМ взрослого человека, как в активных, так и в покоящихся популяциях, выявляли ангиогенные факторы транскрипции, такие как $VEGF$ и $Tie-1$, которые имеют существенное значение для инициации неоваскуляризации [Conrad, Huss, 2005]. В последние годы установлено, что клеткам, эволюционно связанным с развитием предшественников эндотелиальных или муральных клеток, необходима активность $Pim-1$ — фактора, который во время васкулогенеза действует, вероятно, как эффектор, снижающий экспрессию $Flk-1$ [Zipiro et al., 2004]. $Pim-1$ является комплексом сериновых и треониновых киназ, способных фосфорилировать и регулировать активность транскрипционных факторов [Winn, et al., 2003].

Существуют основания полагать, что ЭПК могут быть использованы в клеточной терапии сердца. Так, генетически модифицированные ЭПК, измененные в сторону чрезмерной экспрессии ангиогенных факторов, в частности $VEGF$, индуцировали неоваскуляризацию в ишемическом миокарде, стимулируя местный ангиогенез [Yla-Herttuala, et al., 2003]. Однако механизмы, благодаря которым ЭПК воздействуют на неоваскуляризацию, не полностью раскрыты. Относительно недавно в клинике было подтверждено, что внутрикоронарное вливание ЭПК, происходящих из крови, или суммарной фракции мононуклеарных клеток может быть использовано для улучшения резервного коронарного потока крови и сердечной функции у больных после острого инфаркта миокарда [Assmus, et al., 2002]. Однако пока остается неясным, как улучшение сердечной функции у больных, опосредованное клетками, связано с влиянием на васкуляризацию [Strauer, et al., 2002; Wollert, et al., 2004].

На основании всего вышесказанного можно заключить, что ЭПК являются уникальной клеточной популяцией, не только обеспечивающей формирование сосудистой сети и развитие органов у плодов, а также оказывающейся центральным звеном регенерации в процессах постнатального ангиогенеза при нарушениях проходимости сосудов. Благодаря способности стимулировать местный ангиогенез изучение ЭПК представляет большой интерес при лечении патологий, обусловленных нарушениями проходимости сосудов (ишемии конечностей, диабетической ретинопатии, инфаркте миокарда, эндометриозе и др.). Другим перспективным направлением использования ЭПК в медицине является разработка на их основе тканеинженерных конструкций кровеносных сосудов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Al-Khaldi A., Al-Sabti H., Galipeau J., et al. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model // *The Annals of Thoracic Surgery*. — 2003. — Vol. 75. — P. 204–209.

Assmus B., Schachinger V., Teupe C., et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction // *Circulation*. — 2002. — Vol. 106. — P. 3009–3017.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis // *Nat. Med.* — 2000. — Vol. 6. — P. 389–395.

Conrad C., Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery // *J. Surg. Research*. — 2005. — Vol. 124. — P. 201–208.

Fujiyama S., Amano K., Uehira K., et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1— dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells // *Circ. Res.* — 2003. — Vol. 93. — P. 980–989.

Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U., et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells // *Blood*. — 2000. — Vol. 95. — P. 3106–3112.

Hristov M., Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology and possible clinical relevance // *J. Cell. Mol. Med.* — 2004. — Vol. 8. — P. 498–508.

Iwami Y., Masuda H., Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future // *J. Cell. Mol. Med.* 2004. — Vol. 8. — P. 488–497.

Jackson K.A., Majka S.M., Wang H., et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells // *J. Clin. invest.* — 2001. — Vol. 107. — P. 1395–1402.

Kalka C., Masuda H., Takahashi T., et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97. — P. 3422–3427.

Khakoo A.Y., Finkel T. Endothelial progenitor cells // *Annu. Rev. Med.* — 2005. — Vol. 56. — P. 79–101.

Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms // *Circulation*. — 2004. — Vol. 109. — P. 1543–1549.

Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A., et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 105. — P. 71–77.

Majka S.M., Jackson K.A., Kienstra K.A., et al. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration // *J. Clin. Invest* 2003. — Vol. 111. — P. 71–79.

Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors // *Blood*. — 2000. — Vol. 95. — P. 952–958.

Rosenthal N. Machinations of the marrow // *J.Clin.Invest.* — 2003. — Vol. 111. — P. 29–30.

Strauer B.E., Brehm M., Zeus T., et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans // *Circulation*. — 2002. — Vol. 106. — P. 1913–1918.

Urbich C., Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology // *Circ. Res.* — 2004. — Vol. 95. — P. 343–353.

Wartenberg M., Donmez F., Budde P., et al. Embryonic stem cells: a novel tool for the study of antiangiogenesis and tumor-induced angiogenesis // *Stem Cells. Handbook of Experimental Pharmacology* / Eds.: Wobus A. M., Boheler K. R. — Springer-Verlag. — 2006. — Vol. 174. — P. 53–71.

Williams G., Krajewski C., Dagher F., et al. Host repopulation of endothelium // *Transplant. Proc.* — 1971. — Vol. 3. — P. 869–72.

Winn L. M., Lei W., Ness S. A. Pim-1 phosphorylates the DNA binding domain of c-Myb // *Cell. Cycle.* — 2003. — Vol. 2. — P. 258–262.

Wollert K. C., Meyer G. P., Lotz J., et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial // *Lancet.* — 2004. — Vol. 364. — P. 141–148.

Yamaguchi J., Kusano K. F., Masuo O., et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization // *Circulation.* — 2003. — Vol. 107. — P. 1322–1328.

Yin A. M., Miraglia S., Zanjani E. D., et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells // *Blood.* — 1997. — Vol. 90. — P. 5002–5012.

Yla-Herttuala S., Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 694–701.

Zippo A., De Robertis A., Bardelli M., et al. Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro // *Blood.* — 2004. — Vol. 103. — P. 4536–4544.

ГЛАВА 16. КЛЕТКИ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

16.1. Выделение стромальных клеток жировой ткани

Жировая ткань происходит из эмбриональной мезенхимы. У взрослого человека в состав жировой ткани входят жировые клетки — адипоциты, а также клетки стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани: преадипоциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов, периваскулярные фибробласты и поддерживающая волокнистая коллагеновая строма. В строме обнаруживается наличие популяции стволовых/прогениторных клеток с мультилинейным потенциалом дифференцировки, во многом сходных с МСК, происходящими из КМ. Учитывая, что жировая ткань в значительных количествах (до 300 мл и более) может быть получена под местной анестезией при сравнительно малоболезненной косметической липосакции, липоаспирации подкожного жира или путем эксцизии жировых отложений, эта ткань может явиться альтернативным КМ источником МСК для трансплантации и тканевой инженерии.

Zuk и др. [846, 847] впервые установили, что жировая ткань человека является источником мультипотентных стволовых клеток (СК), причем источником достаточно богатым — из 300 мл жира авторы получали от 10 до 20 × 10⁶ клеток, названных ими «СК обработанного липоаспирата» («processed lipoaspirate», PLA). Метод этих авторов, схематически приведенный на рис. 16.1, заключался в обработке липоаспирата коллагеназой (фрагменты жировой ткани инкубировали при 37°C в 0,075 % растворе коллагеназы тип I в течение 30 мин.). Центрифугирование первичной суспензии приводило к ее разделению на две фракции. В верхнем светлом слое располагались адипоциты, а в осадке — клетки СВФ с примесью клеток крови. Эритроциты удаляли с помощью инкубации в лизирующем растворе хлорида аммония, а другие клетки крови, обладающие слабой адгезивной способностью, выводились при пассировании.

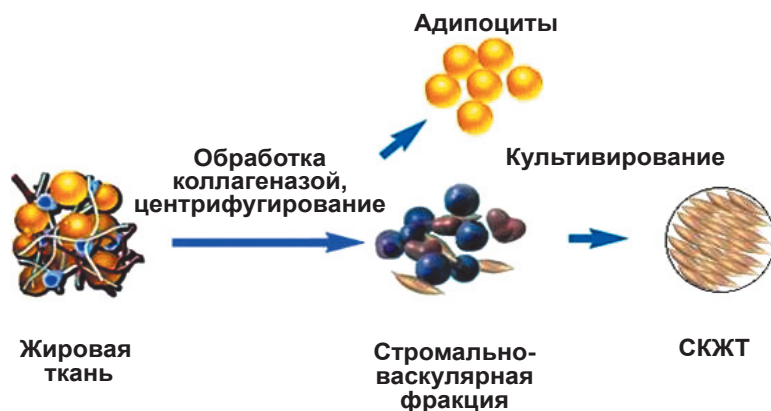
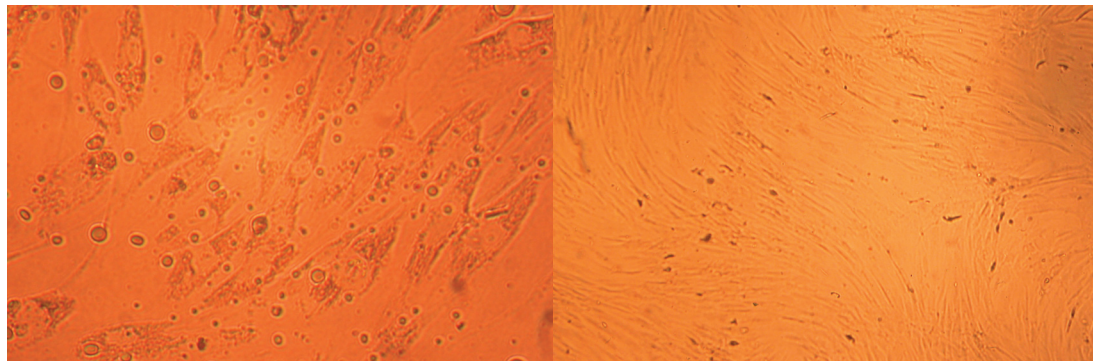


Рис. 16.1 Схема выделения стромальных клеток жировой ткани

Результаты исследований Петренко А. Ю. с сотр. [23] показали, что первичная культура адгезивных клеток жировой ткани состоит из морфологически различающихся элементов, что связано с разнообразием исходного спектра клеток в составе СВФ. В ходе монослойного культивирования происходила постепенная очистка культур от слабо адгезивных клеток, и на 5-е сутки культивирования наблюдался равномерный рост клеток по всей поверхности культурального пластика (рис. 16.2. А). К 10–12 суткам культивирования адгезивные клетки СВФ жировой ткани формировали 70–80 % конфлюентного монослоя, после чего выполнялось их субкультивирование с коэффициентом пересева 1:3. В дальнейшем время достижения указанного состояния монослоя составляло в среднем 3 суток на протяжении 5 пассажей.

В процессе субкультивирования в описанных условиях гетерогенность исходной суспензии клеток СВФ жировой ткани постепенно снижалась; большинство культивируемых клеток имело характерную веретенообразную форму, небольшое овальное ядро, и уже после 3–4 пассажей культура СКЖТ была представлена популяцией преимущественно фибробластоподобных клеток (рис. 16.2. Б.). По мере формирования монослоя клетки образовывали характерные «потoki» и «завитки», выполненные удлинёнными веретенообразными клеточными элементами. В ходе каждого пассажа количество клеток увеличивалось в среднем в 2 раза, что согласуется с данными литературы [Лагарькова и др., 2006; 846].



А **Б**
Рис. 16.2. Первичная культура клеток СВФ жировой ткани

Представлена морфология клеток на 5-е сутки культивирования (А) и после 4-го пассажа (Б). Прижизненное наблюдение, ув. 200.

Описанный выше метод выделения применялся в том же или несколько изменённом виде во всех последующих исследованиях СК жировой ткани, но при этом часто изолированные клетки получали новое название: адгезивные клетки стромы из жира человека (human adipose-derived adherent stromal, hADAS) [373]; стромальные клетки, происходящие из жира (adipose-derived stromal cells, ASCs) [Lin, et al., 2005]; происходящие из жировой ткани СК взрослых (adipose derived adult stem cells, ADAS); мезенхимальные стволовые клетки, происходящие из жира (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ATD-MSC) [Astori, et al., 2007; 534] и др. По нашему мнению, термин «стромальные клетки жировой ткани» (СКЖТ), широко используемый как в иностранной, так и русскоязычной литературе [35; Lin, et al., 2005], адекватно обозначает объект нашего внимания в данном разделе.

16.2. Иммунофенотип стромальных клеток жировой ткани

Иммунофенотипическая характеристика СКЖТ взрослого человека, полученная различными авторами, приведена в табл. 16.1. В целом, при анализе экспрессии поверхностных белков было установлено, что СКЖТ, исследованные после субкультивирования клеток СВФ, подобно МСК КМ, экспрессируют CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 и SH3, и не проявляют экспрессии CD31, CD34 и CD45. Однако при сравнении с фенотипом МСК КМ, приведённым в работе [846], были выявлены отличия в двух маркерах: СКЖТ экспрессировали CD49d и не содержали CD106, в то время как МСК КМ, наоборот, экспрессировали CD106, но не CD49d. Поскольку CD106 являются лигандами рецепторов, участвующих в хоуминге КСК и их мобилизации из КМ [Kronenwentt, et al., 2000], их отсутствие отвергает принадлежность СКЖТ к клеткам гемопоэтической линии.

У СКЖТ, полученных от 7 различных доноров, наиболее постоянными поверхностными белками, выявляемыми у 97 % клеток, были HLA-ABC, CD29 (интегрин $\beta 1$), CD49e (интегрин $\alpha 5/\text{VLA}5$), CD51 (интегрин αV) и CD90 (Thy-1). Более вариabильными были белки CD49b (интегрин $\alpha 2/\text{VLA}-2$), CD49d (интегрин $\alpha 4/\text{VLA}-4$), CD61 (интегрин $\beta 3$), CD138 и CD140a. Остальные из 24-х изученных маркеров отсутствовали или выявлялись только у небольшого числа клеток [373].

Характеристика субкультивированных СКЖТ человека

Автор	Фенотип	Дифференцировка	Факторы, индуцирующие дифференцировку
Gronthos et al. [280]	<u>Позитивны по:</u> HLA-ABC, CD9, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD59, CD105, CD49e, CD54, CD55, CD166 <u>Негативны по:</u> HLA-DR, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD18, CD31, CD45, CD50, CD56	<i>In vitro</i> : остеогенная, адипогенная	<u>Остеогенные:</u> витамин Д3, дексаметазон <u>Адипогенные:</u> инсулин, дексаметазон, 1-метил-3-изобутилксантин, BRL49653
Zuk et al. [846, 847]	<u>Позитивны по:</u> CD13, CD29, CD44, CD49d, CD71, CD90, CD105, SH3, and STRO-1 <u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104, CD106	<i>In vitro</i> : остеогенная, адипогенная, хондрогенная, миогенная, нейрогенная	<u>Остеогенные:</u> витамин Д3, аскорбат, β-глицерофосфат <u>Хондрогенные:</u> инсулин, TGF-β1, аскорбат <u>Миогенные:</u> сыворотка КРС и человека, гидрокортизон <u>Нейрогенные:</u> β-меркаптоэтанол
Planat-Benard et al. [596]	<u>Позитивны по:</u> CD34, CD13 <u>Негативны по:</u> CD31, CD14, CD144, CD45	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> : эндотелиальная	Спонтанно в метилцеллюлозной среде (Methocult MG3534)
Brzoska et al. [Brzoska et al., 2005]	<u>Позитивны по:</u> CD10, CD13, CD44, CD90, виментин <u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, and vWF	<i>In vitro</i> : эпителиальная	Ретиновая кислота
Петренко и др. [23]	<u>Позитивны по:</u> CD29, CD44, CD73, CD105 <u>Негативны по:</u> CD34, CD38, CD45	<i>In vitro</i> : остеогенная, адипогенная	<u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон, сыворотка <u>Адипогенные:</u> гидрокортизон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин.
Ying Cao et al. [823]	<u>Позитивны по:</u> CD29, CD44, CD105, CD166, Flk1, HLA-ABC <u>Негативны по:</u> CD31, CD34, CD45, CD106, CD184	<i>In vitro</i> : остеогенная, адипогенная, <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> : эндотелиальная	<u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон, сыворотка <u>Адипогенные:</u> гидрокортизон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин. <u>Эндотелиальные:</u> VEGF, b-FGF, ЭСТ
Astori et al., 2007	<u>Позитивны по:</u> CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 <u>Негативны по:</u> CD34, CD38, CD45, CD133, CD31, CD271	<i>In vitro</i> : остеогенная, адипогенная, хондрогенная	<u>Остеогенные:</u> аскорбат, β-глицерофосфат, дексаметазон. <u>Адипогенные:</u> инсулин, дексаметазон, 1-метил-3-изобутилксантин, индометацин. <u>Хондрогенные:</u> TGF-β3, аскорбат, дексаметазон, пируват.

Относительно экспрессии на СКЖТ общепризнанного маркера КСК и их ранних потомков CD34 существуют некоторые противоречия. Авторы работ [280, 596] выявили CD34⁺ популяцию в суспензии жировых клеток. Эти данные позволили предположить [596] наличие общего предшественника у клеток с эндотелиальным и адипоцитарным фенотипом. Гистологический анализ жировой ткани, проведенный Тракуевым и др. [35], показал, что CD34-позитивные клетки равномерно распределены в ткани и располагаются между адипоцитами. Однако в исследованиях других лабораторий [823; Fraser, et al., 2006] экспрессия этого маркера проявлялась очень слабо или вообще не обнаруживалась. Это может быть обусловлено несколькими причинами: модификациями метода выделения, видом использованных антител, условиями и временем культивирования.

Исследования Ying Cao и сопр. [823], в которых изучали эндотелиальную дифференцировку СКЖТ *in vitro* и *in vivo*, подтвердили наличие в этих клетках CD29, CD44, CD105, CD166 и Flk1 (самый ранний дифференцировочный маркер эндотелия и клеток крови, являющийся одним из рецепторов VEGF), но не обнаружили кроветворных или эндотелиальных маркеров (CD31, CD34, CD45, CD106 и CD184). При культивировании в среде, содержащей VEGF и bFGF, СКЖТ приобретали морфологию эндотелиальных клеток, экспрессировали CD34, PECAM, VE-кадгерин, eNOS и способствовали неоваскуляризации иммунодефицитных мышей при трансплантации, сохраняя при этом экспрессию CD34 человека. Эти результаты позволили авторам прийти к заключению, что полученные *in vitro* эндотелиальные клетки с описанными свойствами, которым присуща экспрессия CD34, происходят из СКЖТ, а не из эндотелиальных клеток, содержащихся в исходном клеточном препарате.

Однако проведенный недавно фенотипический анализ первичной суспензии СВФ и его изменение в ходе субкультивирования [Astori, et al., 2007; Mitchel, et al., 2006] позволяют усомниться в правильности выводов работы [823].

Эти исследования показали, что в первичной суспензии присутствуют клетки, экспрессирующие, главным образом, маркеры эндотелиальных (CD31, CD144, VEGFFr-2, фактор Виллебранта), стромальных (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD166) и кроветворных (CD34, CD45, CD11, CD13, CD14) клеток. При культивировании в «стромальной» среде в течение, по крайней мере, четырех пассажей экспрессия эндотелиальных маркеров сохранялась на уровне первичной суспензии. Следовательно, последующее культивирование в среде с VEGF может способствовать селективному размножению клеток эндотелиального фенотипа.

Определенные успехи были достигнуты и в выяснении природы клеток, экспрессирующих антиген CD34. В первичной суспензии клеток СВФ было выявлено две популяции CD34-позитивных клеток, причем претенденты на гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (CD34⁺, CD45⁺) составляли лишь около 2 % клеток [Astori, et al.]. Для более полного понимания источника гемопоэтических клеток в жировой ткани авторы исследовали колониеобразующую активность CD34⁺-клеток, изолированных с помощью магнитной сепарации. Было установлено, что содержание кроветворных колониеобразующих единиц (КОЕ) в свежевыделенных клетках СВФ сравнимо с периферической кровью. Эти результаты позволяют предполагать, что гемопоэтические CD34⁺-клетки попадают в жировую ткань из циркулирующей крови. При субкультивировании в «стромальной» среде количество клеток, экспрессирующих CD34 антиген, снижается до порога чувствительности метода или вообще исчезает.

Маркеры, ассоциированные со стромальными клетками (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD105), были слабо экспрессированы на свежевыделенных клетках СВФ жира и увеличивались от пассажа к пассажу, превышая 90 % на пассаже 4 (P4) (рис. 16.3). При изучении представленности свыше 170 генов в СКЖТ, полученных от трех доноров, установили, что 66 % этих генов были транскрипированы во всех клетках, а 83 % — обнаруживались по крайней мере в двух из трех популяций. Наиболее часто транскрипированные гены: эндоглин, FGF 2,6 и 7, FGF R3, нейропипин-1, остеонектин, фибронектин, VEGF-D, TNF-α и MMP2 (желатиназа А) были связаны с адгезией клеток, белками матрикса, ростовыми факторами и рецепторами про-

теаз. Эти данные указывают на сходство генного профиля СКЖТ и МСК из стромы КМ. В то же время СКЖТ не экспрессировали ряд белков, которые считаются молекулярными маркерами ранних СК, такие как CD133, мембранный транспортер ABCG2 и теломераза [373].

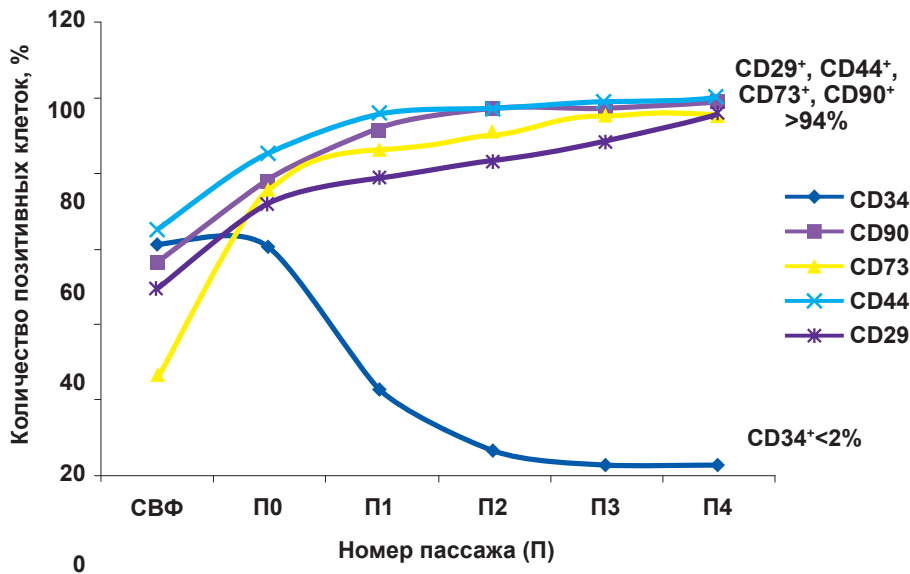


Рис. 16.3. Изменение иммунофенотипа СКЖТ в процессе субкультивирования (по Mitchel, et al., 2006).

16.3. Дифференцировочный потенциал мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани

16.3.1. Дифференцировка СКЖТ в мезодермальные линии

СКЖТ способны к индуцированной дифференцировке in vitro в адипогенном, остеогенном, хондрогенном, эндотелиальном, миогенном, гепатическом, эпителиальном и нейрогенном направлениях. Поскольку до настоящего времени не существует надежных методов определения in vitro функциональных свойств хондроцитов, остеоцитов и миоцитов, дифференцировка СКЖТ в адипогенном направлении имеет явное преимущество для изучения биологии развития соединительной ткани, так как адипоциты обладают двумя уникальными свойствами: 1) запасают энергию в форме триглицеридов, которые освобождаются при липолизисе в виде глицерина и свободных жирных кислот; 2) секретируют в кровь специфические для жира белки, в частности, лептин и адипонектин.

Адипогенная дифференцировка СКЖТ обычно индуцируется внесением в среду изобутил-метилксантина, дексаметазона, инсулина или индометацина. Ее эффективность оценивается в культуре на основании появления клеток округлой формы, содержащих внутриклеточные липидные капли, которые окрашиваются красителем Oil Red O (рис. 16.4). Кроме того, адипогенная индукция СКЖТ приводит к значительному увеличению активности глицерол-фосфатдегидрогеназы — фермента, участвующего в синтезе триглицеридов, а также в экспрессии ряда генов и/или белков, вовлекаемых в биосинтез и хранение липидов, в частности, PPAR γ 2 (жироспецифический фактор транскрипции, функционирующий в преадипоцитах), липопротеиновая липаза (фермент, высвобождающий жирные кислоты из липопротеидов крови, повышающийся во время липогенеза), аP2-белок (связан с накоплением липидов внутри зрелых адипоцитов), мРНК лептина и GLUT4 [846].

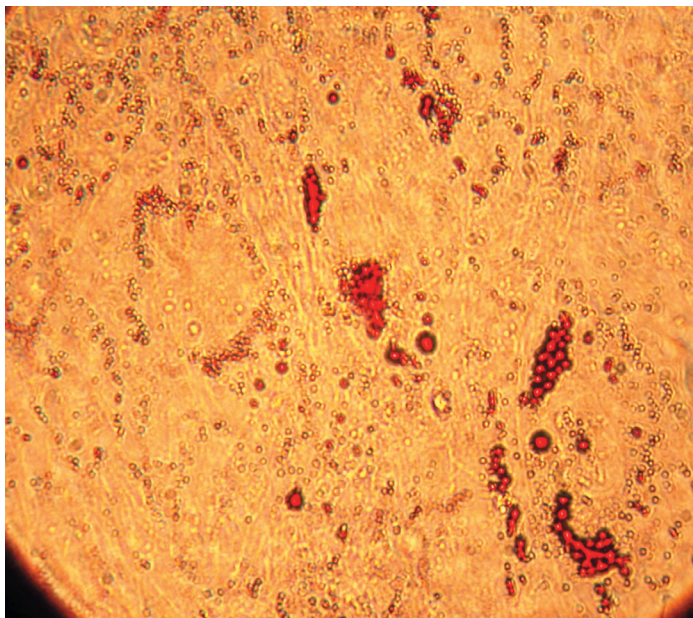


Рис. 16.4. Накопление нейтральных липидов в СКЖТ

Представлена морфология клеток 4-го пассажа через 3 недели культивирования в среде, индуцирующей адипогенез. Окраска Oil Red. Ув. 200.

Другие авторы [Dicker, et al., 2005] изучали функциональные свойства адипоцитов человека, полученных путем дифференцировки СКЖТ и МСК, выделенных из КМ. Оба типа клеток проявляли сходную липолитическую способность при стимуляции катехоламинами, включая выраженный антилиполитический эффект, опосредованный через $\alpha 2$ -адренорецепторы. Оба типа клеток с одинаковой скоростью секретируют специфические факторы жировых клеток — лептин и адипонектин и сохраняли способность к дифференцировке в течение, по крайней мере, 15 пассажей.

Остеогенную дифференцировку индуцируют при помещении СКЖТ в среду, содержащую аскорбат, β -глицерофосфат, дексаметазон или витамин Д₃. Через 2–4 недели культивирования дифференцировку оценивают по появлению активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и кальцификации матрикса, которую визуализируют окрашиванием ализариновым красным и по Ван Коссу. На рис. 16.5 индукция клеток СКЖТ в «остеогенной» среде, содержащей витамин Д₃, приводит к развитию процессов, свидетельствующих об остеогенезе: раннему повышению активности ЩФ и минерализации матрикса; экспрессии большинства генов, подтверждающих остеогенную дифференцировку, а именно: *c-fos* и *msx2* — генов, участвующих в дифференцировке остеобластов; RXR-ретиноидных рецепторов; VDR — рецепторов витамина D; PTHR — рецепторов паратормона; остеопонтина; остеонектина; CBFA-1 — фактора транскрипции, связывающего с промоторами ряд остеогенных генов, и коллагена типа 1 [846]. Авторы наблюдали также раннюю экспрессию остеокальцина, подавляемую экспозицией с дексаметазоном. На СКЖТ была подтверждена чрезвычайно важная роль BMP-2 в качестве остеоиндуктивного фактора. Клетки СКЖТ, трансфицированные аденовирусом, несущим сДНК BMP-2, были способны сами образовывать BMP-2.

Хондрогенная дифференцировка СКЖТ в средах, содержащих TGF- $\beta 1$, инсулин и аскорбат, характеризуется образованием плотных узелков, проявляющих типичные черты клеток, развивающихся в направлении хондрогенеза, а именно: накопление сульфатированных протеогликанов и появление изоформы коллагена типа II и богатых лейцином небольших протеогликанов декорина и бигликана; поздняя экспрессия коллагена типа X — маркера гипертрофи-

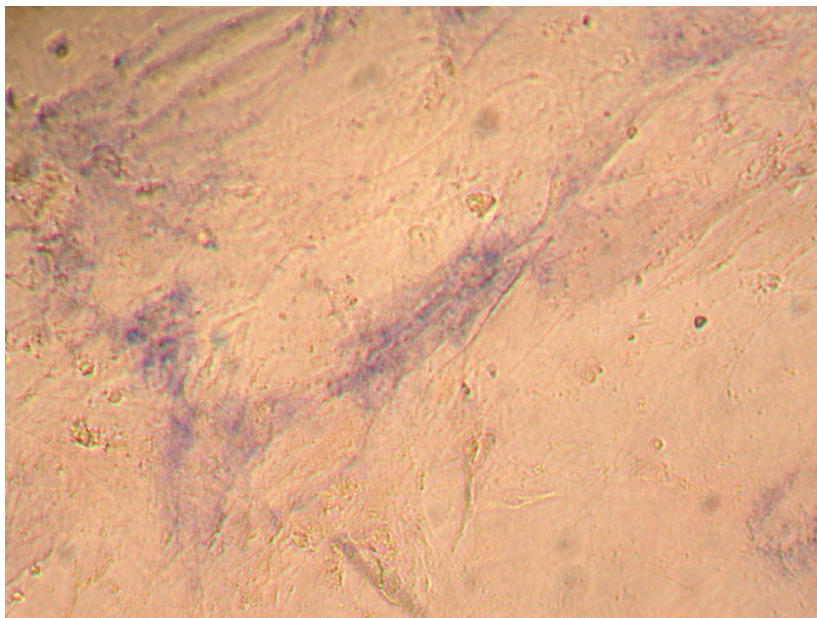


Рис. 16.5. Остеогенная дифференцировка СКЖТ в среде, индуцирующей остеогенез.

Продолжительность культивирования — 21-е сутки. Положительная окраска на щелочную фосфатазу. Ув. 200.

ческих хондроцитов; экспрессия ряда факторов транскрипции, таких как *myf6*, *myf5*, *myod1*, миогенин, и структурных белков десмина и миозина [846]. Erickson, et al. [229] продемонстрировали, что СКЖТ человека, могут образовывать у иммунодефицитных мышей характерные молекулы хрящевого матрикса. Другие авторы [Lin, et al., 2005], пометив СКЖТ зеленым флуоресцирующим белком (GFP), доказали, что они могут быть индуцированы к хондрогенезу *in vitro*. Методами иммуноцитохимии, PCR-RT и Western Blot в меченых дифференцированных клетках были выявлены такие важные компоненты хрящевой ткани, как SOX9, коллаген типа I, коллаген типа II, агрекан и коллаген типа X. При длительном культивировании в моно-слое хондрогенные линии СКЖТ подвергались, подобно нормальным хондроцитам, фенотипической модуляции, определяемой как дедифференцировка.

Исследования хондрогенной дифференцировки СКЖТ *in vitro* и *in vivo* предполагают перспективность их использования для восстановления дефектов хряща. Вследствие слабой регенеративной способности хондроцитов поражения хрящевой ткани не поддаются спонтанному восстановлению и заживлению. В этих случаях трансплантация аутологичных СК или созданной на их основе биоинженерной конструкции может компенсировать дефект хрящевой ткани. В настоящее время как исходный материал для биоинженерии хряща используются клеточные популяции надкостницы или КМ, содержащие СК, которые могут быть индуцированы к хондрогенезу. Однако получение СК из этих источников не обеспечивает большого выхода клеток, и методы их выделения болезненны и утомительны. Напротив, хондрогенная индукция СКЖТ в среде, содержащей трансформирующий фактор роста (TGF- β 1), обеспечивает высокий темп пролиферации хондроцитов и синтез ЭКМ. Короткое время жизни ростовых факторов может быть препятствием для пролиферации хондроцитов *in vivo*. К тому же, прямое введение TGF- β 1 в организм пациента небезопасно из-за возможности развития воспаления, образования остеофитов, фиброза и эрозии хряща. Можно предположить, что сохранение необходимой концентрации TGF- β 1 будет обеспечено применением СКЖТ, генетически модифицированных к образованию необходимой концентрации TGF- β 1. С другой стороны, более реальным для практической медицины подходом является направленная индукция хондрогенной диффе-

ренцировки СКЖТ в культуре с последующей трансплантацией в зону повреждения. Однако прежде всего необходимо ответить на вопрос: могут ли клетки, полученные из жировой ткани, выполнять функцию хряща *in vivo*.

Nathan и др. [534] на основании биомеханических и морфологических исследований показали, что в регенерации остеохондральных дефектов мышелка бедра кролика СКЖТ проявили себя лучше, чем МСК, выделенные из надкостницы. Сравнительное изучение способности СК, выделенных из КМ, надкостницы и жировой ткани, корректировать частичную задержку роста кости у кроликов было проведено в работе [James, et al., 2005]. Авторы отмечают, что все исследованные клеточные препараты демонстрировали хондрогенный и остеогенный потенциал дифференцировки *in vitro*. Вместе с тем, в системе *in vivo* лучшую коррекцию роста кости обеспечивали препараты из КМ и надкостницы. Исследователи из Кореи, сравнившие потенциал остеогенеза и хондрогенеза у СКЖТ и МСК КМ, также отдали предпочтение последним [Gun-II Im, et al., 2005]. Для эндотелиальной дифференцировки *in vitro* СКЖТ вносили в лунки планшета с матригелем в среду, содержащую VEGF, b-FGF и сыворотку [823]. Эндотелиальный фенотип устанавливали по экспрессии эндотелиальных маркеров, включающих CD31 (PECAM), CD34, CD144 (VE-кадгерин) и NO-синтазы эндотелиальных клеток (eNOS). Авторы показали, что при культивировании в этих условиях СКЖТ экспрессировали эндотелиальные маркеры. При этом ингибитор киназы PI 3 LY294002 блокировал дифференцировку в эндотелиальном направлении. *In vivo* СКЖТ дифференцировались в эндотелиальные клетки под влиянием местных сигналов и способствовали неоваскуляризации у мышей с ишемией задних конечностей. Эти результаты свидетельствуют о том, что СКЖТ могут быть потенциальным источником эндотелиальных клеток для проведения клеточной противостенокардиальной терапии.

Способность СКЖТ дифференцироваться в миогенном направлении была установлена в работах Zuk и др. [846, 847]. В качестве индукторов миогенной дифференцировки авторы использовали гидрокортизон в сочетании с сывороткой. В работах [29; Di Rocco, et al., 2006] выявлена спонтанная дифференцировка первичной суспензии клеток СВФ в миогенном направлении. Причем миогенная дифференцировка увеличивалась при культивировании в присутствии миобластов как в условиях, исключающих контакт клеток, так и при их совместном культивировании [Di Rocco, et al., 2006]. После сокультивирования и трансплантации в ишемически поврежденные мышцы иммунодефицитных мышей клетки СВФ встраивались в мышечные волокна и экспрессировали дистрофин.

После культивирования в течение 6 недель (3 пассажа) в специфичной для гладких мышц среде в присутствии гепарина клетки СВФ экспрессировали миогенные маркеры — α -актин (ASMA), кальпонин, кальдесмон, SM22, тяжелую цепь миозина (myosin heavy chain, МНС) и смустелин [Rodriguez, et al., 2006]. Следует подчеркнуть, что наличие вышеперечисленных маркеров было подтверждено параллельно генетическими и иммунофенотипическими методами. Более того, авторам удалось показать функцию дифференцированных мышечных клеток: их последовательное сокращение под действием стимулятора холинэргических рецепторов карбохола и последующую релаксацию добавкой конкурентного антагониста мускариновых холинэргических рецепторов атропина. Причем на фармацевтические препараты (карбохол и атропин) отвечали только окончательно дифференцированные в миогенном направлении клетки, но не их коммитированные предшественники.

Чрезвычайно важным, на наш взгляд, результатом этой работы явилась попытка авторов выяснить вопрос: является ли развитие мышечных клеток результатом селекции определенного типа клеток СВФ или дифференцировки СКЖТ. Для решения этого вопроса был проведен клональный анализ первичной суспензии СВФ. Конечным итогом этой работы было выделение и тестирование колоний, клетки которых были способны дифференцироваться как в адипогенном и остеогенном, так и миогенном направлениях.

16.3.2. Дифференцировка СКЖТ в эктодермальные линии

В связи с тем, что жировая ткань, подобно строме КМ, является производным мезодермы, неудивительно наблюдать дифференцировку СКЖТ в мезодермальные линии, но выявлена также возможность дифференцировки этих клеток в эктодермальные линии, в частности, в эпителиальные и нейрогенные клетки. [Brzoska, et al., 2005] показали, что все транс-ретиновые кислоты могут индуцировать СКЖТ к экспрессии цитокератина 18 — маркера эпителиальных клеток.

Нейрогенную дифференцировку обычно оценивают на основании появления клеток характерной морфологии, положительно окрашивающихся на β -тубулин нейроволокон. Zuk и др. [846] нейрогенную дифференцировку СКЖТ оценивали по экспрессии нестина — белка промежуточных филаментов, представленного на высоком уровне в НСК. Учитывая, что позитивное мечение нестином проявляют также миогенные, эндотелиальные и печеночные клетки, авторы работы [846] подтверждали нейрональную дифференцировку СКЖТ экспрессией двух специфических для нейральных клеток белков: NSE (нейронспецифическая энолаза) и NeuN (нейрональный белок ядер). Ещё один коллектив авторов [Safford, et al., 2004] также сообщил, что СКЖТ мыши в определенных условиях способны дифференцироваться по нейрогенному пути с образованием типичных нейрональных и глиальных клеток. Романов и др. [29], которые заменили ФТС в среде культивирования СКЖТ на сыворотку пуповинной крови человека, наблюдали появление в клетках спонтанной (без предшествующей нейрональной индукции) экспрессии β -тубулина.

16.3.3. Дифференцировка СКЖТ в гепатоциты

Недавно появились работы, свидетельствующие о возможности СКЖТ дифференцироваться в гепатоциты — производные эндодермального зародышевого листка [Talens-Visconti, et al., 2006]. Авторы провели двухэтапную гепатическую дифференцировку СКЖТ после предварительного культивирования в безсывороточной среде. На первом этапе клетки 7 дней культивировали в присутствии HGF, bFGF и никотинамида, а на втором — в среду вносили онкостатин М, дексаметазон, инсулин, трансферин, селен и альбумин. В ходе культивирования клетки изменяли фибробластоподобную морфологию на полигональную, что сопровождалось снижением экспрессии маркера стволовых клеток Thy-1. В течение 21 дня культивирования СКЖТ вырабатывали специфические для печени транскрипционные факторы (C/EBP β и HNF4 α) и экспрессировали маркеры гепатоцитов (альбумин и цитохром P-450).

16.4. Перспективы клинического применения стволовых клеток жировой ткани

Решающим подтверждением наличия в жировой ткани СК явилось получение из единичных СКЖТ клонов, обладающих мультилинейным потенциалом дифференцировки [846]. Многие исследователи отмечают большое сходство популяций СКЖТ и МСК КМ. В связи с этим был даже поставлен вопрос, не являются ли СКЖТ популяцией МСК, которая попадает в жировую ткань из периферической крови. Однако такое предположение кажется сомнительным, поскольку число МСК в строме КМ очень небольшое (примерно 1 МСК на 10^5 клеток) [125; Talens-Visconti, et al., 2006] и, очевидно, еще ниже в периферической крови. Вряд ли такой низкий уровень может обеспечить относительно высокие уровни дифференцировки, наблюдаемые в работе со СКЖТ. В то же время другие исследования [Astori, et al., 2007; Mosley, et al., 2006] показали, что содержание МСК во фракции адгезивных клеток, извлеченных из жировой ткани, в 10–1000 выше, чем в соответствующей фракции КМ. Помимо этого существуют некоторые отличия популяций СКЖТ и МСК: во-первых, при культивировании МСК необходим скрининг сыворотки, тогда как для экспансии и дифференцировки СКЖТ он необязателен; во-вторых, МСК не подвергались хондрогенной или липогенной дифференцировке в тех условиях, которые были выдержаны в работе со СКЖТ [846].

В последнее время появились работы, в которых проведены прямые сравнительные исследования свойств МСК, изолированных из жировой ткани и КМ. Одни авторы [Noel, et al., 2008] в системах *in vitro* и *in vivo* показали, что СКЖТ и МСК КМ проявляют одинаковую способность к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях. Эти результаты не полностью согласуются с данными других работ [Bochev, et al., 2008; Zaminy, et al., 2008]. Так, Bochev и др., исследуя СКЖТ и МСК КМ *in vitro* в одинаковых условиях, установили, что оба типа стромальных клеток демонстрируют практически идентичные морфологические, иммунофенотипические, колониеобразующие свойства и способность к дифференцировке в адипогенном направлении. Однако СКЖТ проявляли меньший потенциал к дифференцировке в остеогенном направлении, чем МСК КМ. Сходные результаты о меньшем остеогенном потенциале СКЖТ были получены также в работе [Zaminy, et al., 2008]. При этом остеогенный потенциал стромальных клеток КМ стимулировался мелатонином, а потенциал жировой ткани — подавлялся.

Обсуждая перспективу клинического применения СКЖТ целесообразно привести результаты исследования [Bochev, et al.], в котором установлено, что СКЖТ в значительно большей степени, чем МСК КМ, проявляют иммуномодулирующий эффект (ингибируют продукцию иммуноглобулинов и подавляют функцию В-лимфоцитов). Приведенные данные по сравнительному изучению стромальных клеток жировой ткани и КМ показывают, что СКЖТ можно рассматривать в качестве полноценной альтернативы МСК КМ для клинического применения. Это заключение подтверждается клиническими наблюдениями. В частности, СКЖТ были успешно применены для лечения ректовагинальной фистулы у больной с болезнью Крона [Garcia-Olmo, et al., 2003; Fraser, et al., 2006]. Но следует все же отметить, что роль СКЖТ в организме не полностью ясна. Неизвестно, находятся ли они в дормантном состоянии с самых ранних стадий дифференцировки или пролиферируют в замедленном ритме, замещая дегенерирующие или с нарушенной функцией клетки.

Таким образом, изначально гетерогенная стромально-васкулярная фракция жировой ткани содержит популяцию стромальных клеток, характеризующихся высокими адгезивными свойствами, фенотипом, характерным для МСК, и способностью к мультилинейной дифференцировке. Относительная простота и низкая травматичность процедуры получения жировой ткани, возможность выделения из нее значительного количества стволовых/прогениторных клеток, способных к селективному размножению в недифференцированном состоянии с последующей дифференцировкой в клетки различных тканей, позволяют рассматривать СКЖТ в качестве перспективного объекта для аутологических трансплантаций.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Лагарькова М.А., Лякишева А.В., Филоненко Е.С. и др. Характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, выделенных методом иммуномагнитной селекции // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 3–7.

Astori G., Vignati F., Bardelli S., et al. «In vitro» and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells // J. Transl. Med. — 2007. — Vol. 5, N1. — P. 55.

Bochev I., Elmadjian G., Kyurkchiev D., et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro // Cell Biol Int. — 2008. — Vol. 32, 4. — P. 384–393.

Brzoska M., Geiger H., Gauer S., et al. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2005. — Vol. 330. — P. 142–150.

Di Rocco G., Iachininoto M.G., Tritarelli A., et al. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells // J. Cell. Science. — 2006. — Vol. 119, 14. — P. 2945–2952.

Dicker A., Le Blanc K., Gaby A., et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue // Exp. Cell. Research. — 2005. — Vol. 308. — P. 283–290.

Fraser J.K., Wulur I., Alfonso Z., Hedrick M.H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology // Trends in Biotechnology. — 2006. — Vol. 24, № 4. — P. 150–154.

Garcia-Olmo D., Garcia-Arranz M., Garcia L. G., et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy // *Int. J. Colorectal Dis.* — 2003. — Vol. 18. — P. 451–454.

Gun-Il Im, Shin Y-W., Lee K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells // *Osteoarthritis and Cartilage.* — 2005. — Vol. 13. — P. 845–853.

James H. P., Li Li, Yee-Hong T., et al. Comparative Study of the Ability of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Periosteum, and Adipose Tissue in Treatment of Partial Growth Arrest in Rabbit // *Tissue Eng.* — 2005. — Vol. 11, № 5/6. — P. 904–912.

Kronenwentt R., Martin S., Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells // *Stem Cells.* — 2000. — Vol. 18. — P. 320–330.

Lin Y., Tian W., Chen X., et al. Expression of exogenous or endogenous green fluorescent protein in adipose tissue-derived stromal cells during chondrogenic differentiation // *Mol. Cell. Biochem.* — 2005. — Vol. 277. — P. 181–190.

Mitchel J. B., McIntoch K., Zvonic S., et al. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers // *Stem Cells.* — 2006. — Vol. 24. — P. 376–385.

Mosley T. A., Zhu M., Hedrick M. H. Adipose-Derived Stem and Progenitor Cells as Fillers in Plastic and Reconstructive Surgery // *Plast. Reconstr. Surg.* — 2006. — Vol. 118, 3. — P. 121–128.

Noël D., Caton D., Roche S., et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials // *Exp. Cell Res.* — 2008. — Vol. 314, 7. — P. 1575–1584.

16. *Rodríguez L. V., Alfonso Z., Zhang R., et al.* Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells // *PNAS.* — 2006. — Vol. 103, 32. — P. 12167–12172.

17. *Safford K. M., Safford S. D., Gimble J. M., et al.* Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells // *Exp. Neurol.* — 2004. — Vol. 187. — P. 319–328.

18. *Taléns-Visconti R., Bonora A., Jover R., et al.* Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells // *World J. Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 12, 36. — P. 5834–5845.

19. *Zaminy A., Ragerdi Kashani I., Barbarestani M., et al.* Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor // *Iran Biomed. J.* — 2008. — Vol. 12, N.3. — P. 133–141.

ГЛАВА 17. АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ СЕРДЦА

Широко распространено мнение, что кардиомиоциты взрослых млекопитающих, в том числе и человека, претерпели конечную дифференцировку и не могут уже делиться для образования новых миоцитов. В миокарде отсутствуют клетки, подобные сателлитным клеткам скелетных мышц, которые являются незрелыми миоцитами и имеют большой потенциал к митотическому делению. Кардиомиоциты не могут пролиферировать, так как строго ориентированные агрегаты сократительных белков препятствуют цитокинезу при митозе. При инфаркте миокарда митотическое деление в кардиомиоцитах не продвигается дальше кариокинеза, и регенерация заканчивается формированием полиплоидных кардиомиоцитов [11]. Замещение дефекта миокарда происходит без участия кардиомиоцитов, главную роль в нем играют пролиферирующие фибробласты. Оставшиеся после повреждения миоциты реагируют на повышение нагрузки сердца, подвергаясь гипертрофии. Зона инфаркта растягивается и подвергается рубцеванию, а непораженные области гипертрофируются и затем расширяются. Происходит комплексная адаптивно-компенсаторная перестройка сердца — ремоделирование [Pfeffer, 1995]. Под микроскопом наблюдается удлинение и истончение миофибрилл, увеличение расстояния между кардиомиоцитами, миокардиофиброз.

Гипертрофированные миоциты не могут успешно поддерживать функциональную активность органа, в результате чего в течение нескольких месяцев или лет развивается сердечная недостаточность. Приобретенная недостаточность сердца причиняет страдания миллионам людей, только в США ежегодно диагностируется до 400000 новых случаев этого заболевания [11]. Огромное влияние заболеваний сердца на смертность и качество жизни, а также недостаток донорских сердец для органной трансплантации обуславливают интерес к исследованиям по трансплантации различных типов клеток в сердце в попытке достичь их приживления. Бесспорно, трансплантация аутологичных СК в больное сердце имеет явные преимущества перед трансплантацией аллогенного органа в силу того, что она обходит необходимость донора и применения иммуносупрессии, обязательной для подавления отторжения трансплантируемого сердца. В настоящее время обсуждается возможность применения для клеточной терапии сердца целого ряда стволовых/прогениторных клеток, включая ЭСК, СК из специализированных клеток зародышевых листков, миобласты, кардиомиоциты, МСК КМ, генетически модифицированные фибробласты и др. Существуют даже экспериментальные данные о возможности дифференцировки клеток печеночной линии в кардиомиогенном направлении. Так, из печени молодого самца крысы породы Fisher 344 была получена клеточная линия WP-F344, которую метили геном Lac Z (β -галактозидаза) E.Coli. Эти клетки вводили в левый желудочек сердца самки мыши nude и спустя 6 недель выявляли дифференцировку их в кардиомиоциты. Клетки, содержащие Y-хромосому, экспрессировали, кроме β -галактозидазы, сердечный тропонин T [Malouf, et al., 2001]. Однако выбор наиболее приемлемого источника клеток для терапии сердца еще не сделан.

Основная проблема заключается в том, что все клетки миокарда должны быть интегрированы между собой для обеспечения координированной работы миокарда как единого целого. В здоровом сердце электромеханическая интеграция осуществляется посредством специализированных контактов в области вставочных дисков, в составе которых имеются зона прикрепления миофибрилл (fascia adherens), щелевые контакты, десмосомы. Fascia adherens и десмосомы выполняют механическую функцию, а щелевые контакты служат проводниками электрических импульсов. Успех пересадки клеток в миокард будет определяться возможностью взаимодействия их с клетками реципиента и микроокружением. При этих условиях есть вероятность образования контактов между клетками донора и реципиента. Наиболее оптимальным для этого является введение трансплантируемых клеток в пограничную зону инфаркта [11].

17.1. Кардиогенез человека

В генезисе сердца человека во время эмбрионального развития участвуют, по крайней мере, клетки из трех источников [Angelini, Markwald, 2005]:

1. Кардиогенная или примордиальная сердечная мезодерма, образующая кардиомиоциты, а также фибробласты, клетки гладких мышц и некоторые эндотелиальные клетки;
2. Прозепикардиальные популяции, образующие коронарные артерии эпикарда и, вероятно, некоторые эндотелиальные клетки и гладкомышечные волокна;
3. Примитивная эктодерма нейрального гребня, из которой развиваются средние оболочки артерий и перегородки больших сосудов.

Решающим этапом в развитии сердца эмбриона является закладка примордиальных клеток. Некоторые ранние мультипотентные клетки, первично локализующиеся в парных симметричных зонах латеральной мезодермы (брюшная пластинка), мигрируют и сливаются по срединной линии. На этот процесс, во время которого образуется много эндогенных паракринных факторов [Eisenberg, et al., 2004], оказывает индуктивное влияние передняя энтодерма [Nakamura, Schneider, 2003]. При этом образуются индуцирующие и ингибирующие факторы, включающие, с одной стороны, костные морфогенетические белки (BMP) и факторы роста фибробластов (FGF), а с другой — ингибирующие факторы сигнальной системы Wnt [Behfar, et al., 2002].

Миокардиальный клеточный фенотип складывается из генной экспрессии множества специфических уникальных транскрипционных факторов и белковых молекул, которые появляются во время эмбрионального развития во временной и пространственной последовательности [Behfar, et al., 2002]. Внесердечная мезодерма обычно не участвует в образовании ткани сердца, но она может быть вовлечена в этот процесс при трансплантации в специфическое для сердца окружение [Sachinidis, et al., 2003; Solloway, Harvey, 2003]. Экстраклеточная задняя мезодерма также обычно не образует ткань сердца, но начинает экспрессировать сердечный фенотип после обработки внеклеточными регуляторами, такими как BMP, FGF и Dickkopf-1 (Dkk-1) [Sachinidis, et al., 2003; Solloway, Harvey, 2003]. Эти данные предполагают, что экстраклеточный матрикс является важным носителем сигнальных инструкций и способен вызывать клеточную миграцию, необходимую для приобретения должной внутриклеточной пространственной и функциональной организации. Для формирования конечных сердечных камер необходима спецификация миокарда в предсердия, желудочки и проводящие элементы [Eisenberg, et al., 2005]. Это осуществляется под влиянием нескольких генов, кодирующих транскрипционные факторы Hand 1, Cited 1, Irf 1/2/3, белков коннексина 40 и 43, секретиремого пептида натрийуретического фактора предсердий и белка цитоскелета Chisel [Sachinidis, et al. 2003].

17.2. Стволовые клетки сердца в норме и при патологии

В последние годы как в нормальном, так и в патологически измененном сердце взрослого человека были выявлены кардиомиоциты, находящихся в клеточном цикле [Kajstura, et al., 1998]. Было обнаружено, что у больных в ткани сердца, соседствующей с зоной инфаркта, до 4 % миоцитов экспрессируют маркер клеточной пролиферации Ki-67. Повторное вхождение в клеточный цикл было выявлено у 0,08 % миоцитов в регионе, примыкающем к зоне инфаркта, и 0,03 % — в отдаленных регионах. Было предположено, что гиперплазия миоцитов, вызывающая сердечную гипертрофию, обусловлена пролиферацией стволовых клеток сердца [Beltrami, et al., 2001; Urbanek, et al., 2003]. Считают, что эти клетки обладают мультипотентным потенциалом дифференцировки и способны образовывать эндотелиальные и гладкомышечные клетки, а также функционирующие кардиомиоциты [Matsuura, et al., 2004]. Патологоанатомические данные, приведенные во многих работах, также свидетельствуют о том, что в сердце взрослого человека не все клетки подверглись конечной дифференцировке; в нем имеется значительное число СК, способных к самовоспроизведению и дифференцировке в миоциты.

Роль СК отводят небольшим клеткам (6 мкм), равномерно распределенным по всему вентрикулярному и атриальному миокарду с более высоким содержанием в предсердиях и на верхушке желудочков. Фенотип СК сердца Lin^- , c-kit^+ (у грызунов еще Sca-1^+). В отличие от ГСК они не экспрессируют антигены CD45 и CD34. В отличие от МСК после обработки 5-азациитидином СК сердца остаются CD34^- [Davani, et al., 2005]. Также известно, что при стимуляции окситоцином, более сильным индуктором сердечной дифференцировки, чем 5-азациитидин, эти клетки экспрессируют GATA-4 и/или MEF2 [Davani, et al., 2005].

Авторы работы [Beltrami, et al., 2003] подтвердили наличие в сердце взрослой крысы недифференцированных клеток с фенотипом Lin^- c-kit^+ , которые *in vitro* и *in vivo* проявляли все характеристики СК. Эти клетки обладали способностью к самовозобновлению, отличались клоногенным ростом и мультипотентностью, образуя, по крайней мере, три дифференцированных клеточных типа: миоциты, клетки гладких мышц и эндотелиоциты. Хотя содержание этих клеток в разных регионах сердца варьировало, определили, что в среднем одна такая клетка приходилась на 10^4 миоцитов. При введении крысам с ишемией сердца Lin^- c-kit^+ клеток или клонального потомства одной из них выявляли реконструкцию пораженного миокарда с восстановлением до 70 % площади левого желудочка.

В то время как одни исследователи представляют подробные данные содействия СК сердца регенерации миокарда [Dawn, et al., 2005], другие — продолжают считать, что кардиомиоциты не делятся, хотя сохраняют слабую способность синтезировать ДНК. Клинические наблюдения также противоречивы: одни авторы отмечали индукцию СК некардиомиогенеза в трансплантах сердца (до 10 % в миокарде), тогда как другие — не обнаруживали в пересаженном сердце кардиомиоцитов, происходящих от реципиентов, хотя выявляли эндотелиальные клетки такого происхождения. Имеются данные, что после повреждения сердца кардиомиоциты человека приобретают умеренную способность к регенерации [Beltrami, et al., 2003]. С помощью такого объективного метода, как включение меченого тимидина обнаруживали только очень низкие уровни синтеза ДНК. Однако уровни включения тимидина существенно отличались в нормальных и поврежденных кардиомиоцитах мышей и составляли 0,0005 % и 0,008 %, соответственно. Наряду с этим, определены многочисленные факторы, повышающие синтез ДНК в кардиомиоцитах *in vitro*: FGF-1, FGF-2, IGF, EGF, ST-1, NRG1, IL-1b, ITS, TPA, EPO. Факторы, снижающие синтез ДНК в кардиомиоцитах и их пролиферацию *in vitro*: TGF- β , T3, D3, CPA, FK506, рапамицин [Richards, et al., 2002]. При этом было отмечено интересное наблюдение, что отсутствие трехпространственного матрикса в первичных монослойных культурах может влиять на реакцию кардиомиоцитов к действию экзогенных факторов роста.

Результаты работы [Anversa, Nadal-Ginard, 2002] также свидетельствуют о том, что кроме полностью дифференцированных кардиомиоцитов в нормальном сердце присутствуют клетки с мультипотентным дифференцировочным потенциалом. Это могут быть либо резидентные клетки, способные делиться и дифференцироваться в функционирующие миоциты, либо мигранты, происходящие из КМ, которые постоянно колонизируют сердце и также могут образовывать зрелые кардиомиоциты. Хоуминг СК внутри ишемической ткани — многоэтапный процесс, включающий адгезию клеток к эндотелию, транспорт их через стенку кровеносного сосуда и миграцию внутри ткани-мишени. Более полное понимание механизмов хоуминга может помочь усилить местные сигналы хоуминга или увеличить способность СК реагировать на стимуляцию после инфаркта миокарда [Dai, et al., 2005]. Авторы вводили сердечные СК в коронарные артерии после развития инфаркта миокарда. С помощью эхокардиографического анализа было установлено, что введенные клетки ослабляли систолические нарушения левого желудочка. При патологоанатомическом исследовании обнаружили, что сердечные СК индуцировали регенерацию миокарда без проявления клеточного слияния, потому что в новых кардиомиоцитах выявляли только диплоидное содержание ДНК и лишь 2 хромосомы имели коэффициент седиментации 12S.

Применяя технологию Cre/lox, Laugwitz и др. [Laugwitz, et al., 2005] удалось специфически пометить резидентную популяцию кардиогенных клеток-предшественников у крыс, мышей и че-

ловека по гену *islet-1*, экспрессия которого первично обнаруживается в ранних мезодермальных клетках эмбриона, коммитированных в миокардиальную линию. В процессе культивирования *islet-1⁺* клетки, выделенные из постнатального сердца, могли пролиферировать и дифференцироваться в клетки, экспрессирующие миокардиальные маркеры и вырабатывающие потенциал действия. Присутствие в сердце резидентной популяции клеток, экспрессирующих очень ранние эмбриональные маркеры, связанные с кардиогенезом, может рассматриваться как еще одно подтверждение регенеративной возможности миокарда.

Хотя во многих работах было продемонстрировано, что трансплантированные СК способны дифференцироваться в сердечные клетки в сердечной окружающей среде, некоторые исследователи не смогли это подтвердить [Balsam, et al., 2004; Bel, et al., 2003; Murry, et al., 2004]. Причины таких расхождений остаются неизвестными. Эксперименты, связанные с дебатами по этой теме, должны придерживаться следующих условий: обеспечивать надежность метода определения клеточного деления; применять апробированный метод для отличия ядер кардиомиоцитов от ядер клеток, не относящихся к миоцитам; учитывать степень повреждения миокарда, которая может влиять на активность клеточного цикла кардиомиоцитов; и возможность варьирования этой реакции у разных видов животных.

Выявление в сердце СК, способных к регенерации большого количества функционирующих кардиомиоцитов поднимает вопрос о быстром и качественном включении этих клеток в процесс восстановления. Будущие исследования должны найти место СК сердца среди средств действенной регенерации сердца при инфаркте миокарда и другой патологии.

17.3. ЭСК и клетки плодов в перспективе клеточной терапии сердца

Привлекательность применения ЭСК для клеточной терапии сердца объясняется тем фактом, что эти клетки могут сохраняться в виде линии, а после введения в соответствующую культуральную среду дифференцироваться в желаемом направлении. Еще до появления линий ЭСК ряд исследователей рассматривали возможность дифференцировки ЭСК в кардиомиоциты [Maltsev, et al., 1993; Hescheler, et al., 1997; Guan, et al., 1999]. Itskovitz-Eldor, et al. [343] первыми сообщили, что линейные ЭСК человека дифференцируются в культуре в клетки, которые имеют морфологию и маркеры клеток сердца. Другие авторы [379, 810] также показали, что ЭСК человека могут дифференцироваться в миоциты, воспроизводящие структурные и функциональные свойства кардиомиоцитов. В процессе работы с ЭСК установили возможность получения из них клеток, подобных клеткам Пуркинье, синусового узла, предсердий и желудочков сердца. Полученные клетки экспрессировали специфические ионные каналы и структурные белки и проявляли некоторые электрофизиологические свойства [Hescheler, et al., 1997]. Следующим шагом в этом направлении были исследования на животных моделях, ставящие своей целью выяснить, могут ли ЭСК замещать поврежденные клетки сердца и восстанавливать миокард. На модели трансгенных мышей с неповрежденным сердцем было установлено, например, успешное приживание кардиомиоцитов, дифференцированных из ЭСК [Soonpaa, et al., 1994].

После трансплантации кардиомиоцитов плода в миокард изогенного хозяина удалось обнаружить вставочные диски между кардиомиоцитами донора и реципиента [Davani, et al., 2005]. Эти клетки содержали организованные саркомеры, много митохондрий и обладали двухъядерностью, характерной для кардиомиоцитов взрослых. При электрокардиографическом обследовании сердца не было обнаружено признаков аритмии. У собак с дистрофическим миокардом трансплантированные кардиомиоциты плодов образовывали вставочные диски без нарушения нормальной функции сердца. На моделях животных с перевязанной коронарной артерией или поврежденным сердцем в результате криоаппликации было показано, что трансплантированные неонатальные кардиомиоциты дифференцируются в зрелые клетки и экспрессируют значительные количества N-кадгерина и коннексина-43 (маркеры *Fascia adherens* и щелевых контактов, соответственно). Следует отметить, что если трансплантация кардиомиоцитов плодов или новорожденных улучшает функцию миокарда, то трансплантированные кардио-

миоциты взрослых животных не выживают ни в нормальном, ни в поврежденном миокарде [Soonpaa, et al., 1994].

Интересно, что во всех исследованиях, проведенных с использованием СК плодов, наблюдали развитие клеток в нужном направлении, их приживление и улучшение функции миокарда. Тем не менее, существует ряд проблем, ограничивающих клиническое применение этих клеток человека в будущем. Среди них следует отметить: 1) вопросы этического характера, связанные с получением и применением ЭСК и клеток плодов человека; 2) в связи с аллогенной природой необходимость типирования клеток по антигенам МНС и применения иммунодепрессивной терапии; 3) наблюдения, свидетельствующие о повышенной гибели клеток вследствие ишемии при пересадки в миокард кардиомиоцитов, выращенных из ЭСК [Kessler, Byrne, 1999]; 4) сохранение у ЭСК человека некоторого потенциала к образованию тератом, проявляющегося при введении этих клеток иммунодефицитным мышам. Вследствие этих обстоятельств исследователи стали искать альтернативные источники клеток для терапии сердца.

17.4. Перспективы применения предшественников миоцитов в клеточной терапии сердца

Миобласты скелетных мышц в эмбриогенезе и сателлитные клетки взрослых являются предшественниками миоцитов. Они способны пролиферировать и дифференцироваться в зрелые скелетные миоциты, обеспечивая в определенной степени регенерацию скелетной мускулатуры. У плодов и новорожденных миобласты составляют значительную часть скелетных мышц. Преимущества при использовании предшественников скелетных миоцитов в экспериментальных работах — следующие:

- 1) резистентность к ишемии;
- 2) возможность получения аутологичных клеток, исключающих необходимость использования реципиентом иммунодепрессивных препаратов;
- 3) возможность клонирования и генетической модификации *in vitro*;
- 4) способность дифференцироваться в миотрубочки скелетных мышц после трансплантации и выживать в сердце реципиентов без связи с кардиомиоцитами в течение, по крайней мере, трех месяцев [Murphy, et al., 1996; Taylor, et al., 1998].

В многочисленных работах, выполненных с использованием клеточных линий, происходящих из сателлитных клеток или миобластов, было отмечено улучшение функции миокарда после разрастания клеток у животных с экспериментальным повреждением сердца. Но остается неясным, трансформируются ли трансплантированные скелетные миобласты в клетки с кардиомиогенным фенотипом или они функционируют электромеханически как кардиомиоциты после слияния с нативными клетками? Между миобластами скелетных мышц и кардиомиоцитами имеются значительные различия. У первых — отсутствуют межклеточные соединения, называемые вставочными дисками, которые электромеханической связью соединяют соседние кардиомиоциты. Главнейшими белками, участвующими в передаче электрического и механического сигнала у кардиомиоцитов являются, соответственно, коннексин 43 и N-кадгерин. Скелетные миобласты на ранней стадии развития экспрессируют оба белка, которые существенны при слиянии миобластов. Экспрессия этих белков снижается после формирования миотрубочек. До настоящего времени эти белки в трансплантатах клеток зрелых скелетных мышц в поврежденный миокард не выявлялись. Несмотря на это, некоторые исследователи предполагают, что миобласты все же играют роль в регенерации поврежденной мышцы сердца. Они способны мигрировать в пораженный участок, пролиферировать там и сливаться с поврежденными волокнами, индуцируя синтез миогенспецифических белков [140]. Некоторым авторам удалось получить гистологические доказательства дифференцировки трансплантированных скелетных миобластов в кардиомиоциты и формирования вставочных дисков. Однако в других работах трансдифференцировку трансплантированных миобластов в кардиомиоциты не наблюдали [Reinecke, et al., 2002]. На модели поврежденного миокарда было показано, что через 8–12 недель после пере-

садки клетки зрелых скелетных мышц теряют способность экспрессировать N-кадгерин и коннексин 43 и не образуют связи с кардиомиоцитами. При этом клетки с сердечным фенотипом в трансплантатах не обнаруживались. В них выявляли появление многоядерных миобластов без вставочных дисков; экспрессию изоформ миозина, специфических для скелетных мышц, и отсутствие экспрессии сердечного α -миозина. В то же время у трансплантированных клеток отмечали наличие сократительных свойств, присущих скелетным мышцам. Другие авторы, напротив, сообщали, что скелетные миобласты *in vitro* могут экспрессировать белки сердечных межклеточных контактов и образуют электромеханические связи с кардиомиоцитами. Образование щелевых соединений между зрелыми клетками скелетной мышцы и кардиомиоцитами хозяина может зависеть от способа введения скелетных миобластов и ишемического состояния миокарда. Например, при интракоронарном введении скелетных миобластов в неповрежденный миокард коннексин-43 выявляли между разросшимися зрелыми клетками скелетной мышцы и кардиомиоцитами хозяина [цит. Davani, et al., 2005].

Другое значимое различие между сердечными и скелетными мышечными клетками, которое может ограничить применение скелетных миобластов для клеточной терапии сердца, касается кальциевых каналов L-типа. Эти каналы имеют значение для процессов возбуждения — концентрации при соединении сердечных и скелетных мышц, вызванных освобождением кальция из саркоплазматического ретикулума. Механизм этих процессов сложный, включает участие многих мембранных белков, но подробная информация, касающаяся взаимодействия этих белков с кальцием, пока отсутствует. В общем, можно согласиться с авторами работы [11], которые считают, что полученные к настоящему времени данные не позволяют однозначно ответить на вопрос о возможности дифференцировки скелетных миобластов в кардиомиоциты реципиента и образования контактов между клетками донора и реципиента, а также о перспективах применения этих клеток для клеточной терапии сердца. Однако в одной из последних экспериментальных работ [Christman, et al., 2004] вновь было отмечено увеличение выживаемости клеточного трансплантата, снижение зоны инфаркта и повышение потока крови в ишемический миокард после инъекции в инфарктную зону крыс скелетных миобластов, фиксированных на фибриновом пластыре. Имеются также некоторые данные о клиническом применении миобластов скелетных мышц для лечения инфаркта сердца. Herreros и др. [Herreros, et al., 2003] выделили аутологичные миобласты из мышечных биоптатов у 12 больных, перенесших инфаркт миокарда и имевших ишемическую болезнь коронарной артерии. Миобласты культивировали с аутологичной сывороткой в течение 3-х недель. Затем эти клетки вводили непосредственно в зону инфаркта во время операции шунтирования коронарной артерии. Спустя 3 мес. функция левого желудочка и региональная сократимость сегментов сердца, леченных скелетными миобластами, были значительно улучшены. Аналогичные данные, полученные на 10 больных, представлены в работе [Siminiak, et al., 2004]. Таким образом, нельзя сказать, что проблема использования скелетных миобластов в клеточной терапии сердца решена и отвергнута. Большой интерес представляют отдаленные результаты последних клинических трансплантаций. Можно предположить, что о новых методических вариациях трансплантации аутологичных миобластов в большое сердце нам еще предстоит узнать.

17.5. Мезенхимальные стромальные клетки в клеточной терапии сердца

Возможно, что одной из первых работ на животных, в которых сообщалось об улучшении сердечной функции после трансплантации изогенных клеток КМ, было исследование Tomita, et al., 1999. Эти авторы вводили в рубцовую ткань сердца крысы МСК из КМ, обработанные 5-азациитидином (для индукции дифференцировки в клетки, подобные кардиомиоцитам). Было отмечено развитие ангиогенеза, восстановление функции миокарда и заключено, что СК кроветворных тканей могут быть использованы для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Другие исследователи, тоже работающие на крысах, установили, что изогенные МСК КМ даже без обработки 5-азациитидином могут образовывать кардиомиоциты [Wang, et al., 2001].

В этой работе, однако, функцию трансплантированных клеток не определяли. На мышах также была показана возможность получения из МСК КМ кардиомиогенной клеточной линии [476]. После обработки 5-азациитидином клетки приобретали фибробластоподобную морфологию и в них появлялись сокращающиеся структуры, похожие на миотрубочки, соединенные вставочными дисками. Дифференцированные клетки экспрессировали натрийуретические пептиды, α - и β -тяжелые цепи миозина, α -сердечный и α -скелетный актины. При электрофизиологическом исследовании обнаруживались потенциалы синусного узла и кардиомиоцитов желудочков. При электронной микроскопии миотрубочек в них обнаруживали наличие организованных саркомеров, центрально расположенных ядер, многочисленных митохондрий и атриальных гранул [Wang, et al., 2001]. Авторы работы [Liu, et al., 2004] вводили свиньям с инфарктом миокарда аутологичные МСК, засеянные на фибриновый матрикс. С помощью магнитного резонанса было выявлено значительное повышение показателей систолической фракции левого желудочка в зоне инфаркта.

Другие исследователи, проводившие трансплантацию МСК животным, используемым в качестве моделей, и подтвердившие появление экспрессии специфического для мышц фенотипа, предположили влияние сердечного микроокружения на дифференцировку пересаженных МСК [Wang, et al., 2000; Toma, et al., 2002; Tomita, et al., 2002; 673]. В одной работе у инбредных крыс Lewis выделяли МСК, размножали их *in vitro*, метили диаминофенилиндолом и трансплантировали изогенным животным. Спустя 4 недели выявляли экспрессию тяжёлых цепей миозина в меченых клетках, объединение последних с кардиомиоцитами хозяина и формирование вставочных дисков, которые были необходимы для электрофизиологической функции [Wang, et al., 2000]. На модели инфаркта миокарда у мышей получили подобные же результаты, а при гистологическом и иммуногистохимическом анализе обнаружили разрастания МСК в рубцовой ткани сердца. Через 2 недели после трансплантации эти клетки экспрессировали специфические для мышц белки α -актинин, тропомиозин, тропонин Т и фосфоламбан. Кардиомиогенные маркеры в этой работе не определялись [656]. В другом исследовании [562] МСК из КМ трансгенных мышей, меченные GFP и имеющие фенотип Lin^- , c-kit^+ , были введены самкам прямо в миокард, поражённый инфарктом. Клетки, колонизирующие зону инфаркта, экспрессировали маркеры, которые были характерны для кардиомиоцитов, эндотелиальных и гладкомышечных клеток. На другой модели МСК человека, трансфецированные геном Lac Z (β -галактозидаза), трансплантировались в сердце иммунодефицитных мышей. Пересаженные клетки экспрессировали тяжёлые цепи миозина, десмин, α -актин, фосфоламбан и имели характерную саркомерную организацию миотрубочек, подтверждающую саркомиогенную дифференцировку. Но степень выживания трансплантированных клеток была очень низкая: менее 0,5 % спустя 4 дня после трансплантации [Toma, et al., 2002].

В работе [Davani, et al., 2003] МСК имплантировали крысам с перевязанным коронарным сосудом сердца. Спустя 30 дней при иммунофлуоресцентном анализе обнаружили, что некоторые из пересаженных клеток экспрессируют фенотип гладких мышц (α -актин⁺), а в некоторых клетках сформировался эндотелиальный фенотип (CD31⁺). У животных с трансплантированными МСК было отмечено повышение упругости сосудов и при эхокардиографии выявлено улучшение функциональной характеристики левого желудочка.

В целом ряде работ последнего времени было показано, что улучшения, наблюдаемые в инфарктном сердце через 2–4 недели после введения аутологичных МСК или CD34⁺ клеток КМ, обусловлены паракринными эффектами, возникающими при взаимодействии клеток, тогда как сами трансплантированные СК не подвергаются полной миогенной дифференцировке и не обеспечивают заметного замещения рубца мышечными клетками [Tang, et al., 2005; Yoshioka, et al., 2005; Dai, et al., 2005]. Решающая роль паракринных или гуморальных факторов, секретируемых клетками, трансплантированными в зону инфаркта, хорошо демонстрирует работа [Gnecchi, et al., 2005]. Эти авторы через 30 мин. после окклюзии левой коронарной артерии в пограничную зону инфаркта крыс вводили кондиционную среду культивированных МСК, трансдуци-

рованных геном Akt или геном-репортером GFP. Гистологическое исследование, проведенное через 72 ч. после инъекции, показало, что кондиционная среда Akt-МСК значительно ограничивает размеры инфаркта и снижает апоптозный индекс кардиомиоцитов.

Для определения способности клеток человека включаться в сердечную ткань подопытных животных CD34⁺ клетки периферической крови человека вводили крысам через 48 ч. после наложения лигатуры на коронарную артерию. Спустя 2 недели после трансплантации у крыс, инъецированных клетками человека, выявляли более высокие показатели васкуляризации, большее количество клеток в зоне инфаркта и снижение фиброза по сравнению с ложнооперированными животными. Электрокардиографические показатели также были лучше у крыс, получивших инъекцию CD34⁺ клеток человека после ишемического повреждения [394].

Таким образом, многочисленные эксперименты свидетельствуют о высоком потенциале МСК в клеточной терапии сердца.

17.6. Дифференцировка гемопоэтических стволовых клеток в клетки сердца и сосудов

Еще в 1999 г. Bittner, et al. [96] показали, что гемопоэтические клетки КМ, совместимые с клетками реципиента по полу и по антигенам МНС, после трансплантации мигрируют в разные ткани реципиента, в том числе и в сердце. Авторы предположили, что в поврежденном сердце клетки КМ могут дифференцироваться в кардиомиоциты и/или клетки сосудов и улучшать нарушенную функцию органа.

Возможность применения ГСК для восстановления миокарда, пораженного инфарктом, была исследована на мышах в работах Orlic и др. [561–563]. У трансгенных мышей самцов, несущих ген GFP, выделяли кроветворные клетки-предшественники КМ с фенотипом lin^- , c-kit^+ . Клетки вводили изогенным самкам в непораженную ткань миокарда, окружающую зону инфаркта. Донорские клетки, экспрессирующие Y-хромосому и GFP, мигрировали в некротическую зону сердца и занимали 68 ± 11 % его площади. Экспрессия GFP была обнаружена в среднем у 54 ± 8 % новообразованных кардиомиоцитов, эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Эти кардиомиоциты проявляли функциональную компетентность и экспрессировали сердечные факторы транскрипции, включая MEF2 (myocyte enhanced factor 2), GATA-4 и Csx/Nkx2,5 — ранний маркер развития миоцитов. Кроме того, эти клетки экспрессировали коннексин-43, который характеризует развитие щелевых контактов. Было отмечено, что трансплантация Lin^- , c-kit^+ клеток КМ обеспечивало выздоровление до 40 % животных.

Yeh, et al. [Yeh, et al., 2003], применяя в качестве моделей иммунодефицитных мышей и используя молекулярные маркеры, показали, что циркулирующие CD34⁺ клетки периферической крови способны разрастаться в сердце и кровеносных сосудах и трансдифференцироваться в кардиомиоциты, гладкие мышечные клетки сосудов и другие клетки кардиоваскулярного типа. При этом было отмечено, что клеточные разрастания в значительной степени зависят от степени ишемического повреждения.

Введение крысам с острым инфарктом миокарда мобилизованных G-CSF клеток КМ взрослого человека или очищенной популяции CD34⁺ клеток способствует реваскуляризации поврежденного сердца [394]. Тома и др. [Тома, et al., 2002] показали, что введение ГСК из КМ взрослого человека в сердце мыши с индуцированным инфарктом миокарда приводит к образованию новых кардиомиоцитов, сосудистого эндотелия и клеток гладких мышц. Спустя 9 дней после инъекции новообразованная ткань миокарда, содержащая коронарные артерии и капилляры, занимала до 68 % пораженного желудочка сердца. Выживаемость мышей, получивших трансплантаты клеток, была много выше, чем контрольных животных. Мобилизация и стимуляция *in vivo* собственных ГСК мыши под влиянием введения SCF, G-CSF или VEGF также обеспечивала улучшение функции кардиомиоцитов и развитие кровеносных сосудов [561]. У больных с острым инфарктом миокарда спустя 6 месяцев после мобилизации ГСК из КМ отмечали статистически подтвержденное улучшение фракции сердечной

го выброса по сравнению с подобными больными, у которых мобилизацию кроветворных клеток-предшественников не вызывали [Tomoda, Aoki, 2003].

Клетки боковой популяции (Side population, SP) КМ мыши с фенотипом CD34⁻, но c-kit⁺ и Sca-1⁺, способные исключать краску Hoechst 33352, содержали больше ГСК, чем клетки субпопуляции Lin⁻c-kit⁺, обладают способностью как регенерировать скелетные мышцы [Goodell, et al., 1997], так и восстанавливать пораженный инфарктом миокард [345]. Однако пролиферативная активность этих клеток была очень низкая (0,02 % среди кардиомиоцитов и 3,3 % среди эндотелиальных клеток. В более поздние сроки после трансплантации в инфарктном сердце выявляли только ограниченное количество миоцитов, экспрессирующих маркеры донорских клеток. Но все же эти данные позволили предполагать, что в сердце взрослых животных миогенез *de novo* из костномозговых предшественников происходит, хотя и на низком уровне.

Но в это время появились работы, в которых исследователи не смогли подтвердить пластичность костномозговых СК в отношении клеток сердца. В одной из этих работ летально облученным мышам вводили единичные GFP⁺ ГСК и спустя 4–9 месяцев изучали судьбу ГСК в организме химерных животных [771]. Было установлено, что трансплантированные ГСК способствовали образованию только зрелых кроветворных клеток, а на некроветворные ткани заметно не влияли. GFP⁺ клетки не экспрессировали антигены, маркирующие нейральные, мышечные, легочные или кишечные клетки, тогда как гемопоэтический маркер CD45⁺ был обнаружен во всех флуоресцирующих клетках. Авторы заключили, что, по их данным, ГСК не содействуют регенерации некроветворных тканей.

Вскоре эти данные были подтверждены двумя другими работами. В одной из них [Murgu, et al., 2004] дифференцировку ГСК, трансплантированных в нормальный или поврежденный миокард, пытались проследить по экспрессии β-галактозидазы, вытесняемой из кардиоспецифического α-миозина промотором тяжелой цепи. Параллельно проводили совместное культивирование *in vitro* ГСК и кардиомиоцитов реципиента. Активации промотора не было отмечено ни *in vitro*, ни *in vivo*, что позволило авторам заключить, что трансформация ГСК в кардиогенные линии клеток не происходила. В другой работе [Balsam, et al., 2004] различные фракции КМ, обогащенные c-kit, применяли для того, чтобы проследить судьбу ГСК с фенотипом c-kit⁺ у мышей с моделью инфаркта миокарда. В этой работе также не было отмечено выраженной трансдифференцировки ГСК в клетки сердца. Трансплантированные ГСК мало влияли на функцию миокарда и выживаемость инфарктных животных при сравнении с контролями, обработанными физиологическим раствором. Таким образом, результаты этих работ противоречат данным, приведенным выше, но их нельзя игнорировать хотя бы по той причине, что получены они с применением более тонких методов. Противоречивость выводов всех работ данной направленности подчеркивает необходимость проведения тщательного анализа, прежде чем приступать к клиническим испытаниям.

Анализ приведенных выше работ позволяет заключить, что судьба трансплантированных клеток КМ зависит от микроокружения, в которое они попадают. В рубцовой ткани они экспрессируют фенотип гладких мышц, а ближе к сосудам — эндотелиальный фенотип. Даже в миокарде, не имеющем повреждения, эти клетки могут приобретать фенотип кардиомиоцитов [Davaní, et al., 2005]. Предположение, что добавление цитокинов может повышать освобождение клеток КМ и эффективность хоуминга и дифференцировки СК, было проверено на экспериментальных моделях инфаркта. Было установлено, что введение G-CSF и SCF может повышать неоваскуляризацию, но не регенерацию миоцитов [Kang, et al., 2004]. Kawada и др. [Kawada, et al., 2004], напротив, сообщили, что G-CSF мобилизует СК и эти рекрутированные СК дифференцируются в кардиомиоциты. Авторы работы [Ohtsuka, et al., 2004] продемонстрировали, что G-CSF предупреждает ремоделирование левого желудочка, улучшает сердечную функцию, увеличивает число капилляров и снижает количество апоптических клеток в пограничной зоне инфаркта миокарда. Li и др. [Li, et al., 2005] индуцировали миогенную дифференцировку CD117⁺ СК, культивируя их с TGF-β, и имплантировали перепрограммированные клетки в инфарктный миокард.

Через 3 мес. эти клетки экспрессировали миозин в пораженном миокарде. При гистологическом анализе обнаружили регенерацию кардиомиоцитов и значительно повышенную плотность микрососудов в передней стенке левого желудочка. Функциональные параметры этого желудочка также были значительно улучшены. Позже было установлено [Sesti Casilda, et al., 2006], что G-SCF и SCF мобилизуют из КМ кроветворные прогениторные клетки в кровоток и улучшают функцию левого желудочка, но не влияют на ремоделирование или замещение рубца новыми мышечными клетками. На собаках было показано [Linke, et al., 2005], что введение в миокард фактора роста гепатоцитов (HGF) и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) стимулирует резидентные сердечные прогениторные клетки к образованию миоцитов и коронарных сосудов внутри инфарктной зоны и приводит к значительному восстановлению сократительной способности сердца. Авторы заключили, что активация роста резервных клеток миокарда может быть одним из подходов к лечению миокарда после ишемического повреждения.

Существует мнение, что позитивный эффект ГСК на состояние поврежденного сердца может быть обусловлена их слиянием с кардиомиоцитами хозяина. Применив для определения клеточного слияния метод, основанный на рекомбинации Cre/lox Alvarez-Dolado и др. [57], а позже Zhang и др. [Zhang, et al., 2004] показали, что в неповрежденном сердце клетки, происходящие из КМ, действительно могут сливаться с кардиомиоцитами хозяина.

17.7. Перспективы развития клеточной терапии в клинике сердечно-сосудистых заболеваний

Число новых клинических работ, посвящённых обсуждаемым проблемам, возрастает с каждым годом. Уже имеются некоторые клинические данные о дифференцировке аллогенных клеток костномозгового происхождения в сердечные миоциты. Например, у 8 мужчин, получивших трансплантат сердца женщин, выявили наличие высоких показателей химеризма в ткани сердца [Quaini, et al., 2002]. До 18 % миоцитов, 20 % клеток артериол венечных артерий и 14 % клеток капилляров экспрессировали Y-хромосому. Некоторые авторы проводили подкожное введение нефракционированных клеток аутологичного КМ в качестве основного метода лечения острого инфаркта миокарда [Tse, et al., 2003]. Другие авторы сообщили о результатах внутрикоронарного вливания аутологичных нефракционированных прогениторных клеток КМ или крови в качестве стимуляторов ангиогенеза при ишемической болезни сердца [Tse, et al., 2002]. Все эти работы показали, что внутрисердечное вливание клеток аутологичного КМ является безопасной и приемлемой процедурой. Однако остались некоторые спорные вопросы, которые следует учесть в будущих исследованиях. В основном они касаются необходимости определения точного фенотипа введенных клеток; получение данных, подтверждающих выживание, разрастание и/или дифференцировку клеток, а также отражающих изменение функциональных параметров у больных.

Многочисленные данные показывают, что клеточная терапия может быть полезна в лечении заболеваний сердца. Однако отдельные вопросы ещё должны быть проработаны. Например, сколько клеток необходимо ввести больному для получения лечебного эффекта? Как долго будут функционировать введенные клетки? Будут ли результаты, полученные на животных моделях, соответствовать клеточным реакциям у человека? В настоящее время неизвестно даже, будет ли клеточная терапия более полезна в ранние сроки после инфаркта, когда отмечается значительное воспаление, или должно пройти какое-то время между развитием инфаркта и введением клеток. Остается также невыясненным, будут ли трансплантированные клетки нормально функционировать в окружении рубцовой ткани и не повлияет ли на результаты лечения энергичное поступление крови в результате неоангиогенеза.

Клинические работы, исследующие влияние введения клеток аутологичного КМ больным с хронической ишемией миокарда, показали, что внутримышечная инъекция этих клеток относительно безопасная процедура, значительно улучшающая исход лечения больных [Assmus, et al., 2002; Stamm, et al., 2003; Fuchs, et al., 2003; Perin, et al., 2003]. К аналогичным выводам пришли авторы работы [Kuethe, et al., 2004], сообщившие о результатах лечения G-CSF

(10 мкг/кг веса тела/день) 5 больных острым инфарктом миокарда через 48 ч. после успешной реканализации и имплантации стента. Лечение G-CSF продолжалось 7–8 дней, и содержание CD34⁺ клеток достигало пиковых уровней к 5-му дню. Радионуклидная вентрикулография показала значительное улучшение функции левого желудочка. В США наблюдали 14 больных, каждый из которых получил внутрисердечно около 25×10^6 моноклеарных клеток аутологичного КМ. Клетки вводили в зону ишемии, содержащую живую ткань миокарда, которая, по заключению авторов, необходима для обеспечения неоваскуляризации. Спустя 4 месяца у больных отмечали улучшение сердечной перфузии и сократимости по сравнению с исходными параметрами [Perin, et al., 2003]. Неизвестно, прямо ли влияют введенные клетки на восстановление миокарда (через приживание миоцитов или эндотелиальных клеток в сердце) или опосредованно через стимуляцию ангио— или миогенеза. Но ни кратковременной токсичности, ни других неблагоприятных эффектов не наблюдали [Forrester, et al., 2003]. Многие авторы [Chachques, et al., 2004; Charge, Rudnicki, 2004; Hagege, et al., 2003; Smits, et al., 2003] успешно применяли альтернативный тип аутологичных СК — клетки, обогащённые миообластами скелетных мышц, которые вводили в миокардиальную рубцовую ткань во время операции шунтирования коронарных сосудов или путём катетеризации. Однако имеются данные, что скелетные миообласты хуже, чем СК, происходящие из КМ, мигрируют через стенку артерий или капилляров [765, 771].

По распространённому мнению, эндоваскулярное введение (внутривенное или внутрикоронарное) различных типов прогениторных клеток обеспечивало положительные результаты [Assmus, et al., 2002; Smits, et al., 2003; Strauer, et al., 2002; 779]. Самым оптимальным методом оказалась прямая интрамуральная (интерстициальная) инъекция резервных СК в миокард больного, осуществляемая либо во время хирургической операции (эпикардиальный подход) [Forrester, et al., 2003; Hagege, et al., 2003], либо через катетер (эндокардиальный подход) [Forrester, et al., 2003, Perin, et al., 2003; Smits, et al., 2003]. Но при ишемии однократного прямого интрамурального введения СК может оказаться недостаточно. Часто дифференцировке и росту клеток миокарда должна предшествовать реваскуляризация. Предполагают [Angelini, Markwald, 2005], что микроокружение создаёт ту интерстициальную среду, которая посылает сигналы, способствующие дифференцировке СК в воспалительные и миелоидные клетки или в развитие миофибрилл и эндотелиальных клеток.

Возможные подходы к изучению индукции и дифференцировки СК в клетки с сердечным фенотипом интенсивно исследуются. Недавно Heng и др. [Heng, et al., 2004] проанализировали методологию изучения кардиомиогенной дифференцировки СК *in vitro*. Авторы рассмотрели условия получения определённой клеточной среды (миллениума), содержащей различные цитокины, ростовые факторы и синтетические вещества; использование молекул экстраклеточного матрикса; совместное культивирование СК с различными популяциями клеток или со средой, кондиционированной клетками; стимуляцию клеток свободными радикалами и реактивными типами кислорода; применение физических факторов. Авторы пришли к выводу, что пока, к сожалению, нет метода надёжной кардиогенной дифференцировки СК *in vitro*, который можно было бы использовать в клинической практике. Дальнейшее изучение биологии СК и процесса дифференцировки будет способствовать развитию клеточной заместительной терапии для лечения заболеваний сердца, в том числе инфаркта миокарда.

На основании приведенных данных можно заключить, что как в нормальном, так и в патологически изменённом сердце взрослых содержатся мультипотентные СК с фенотипом Lin[−] c-kit, которые могут вызывать образование эндотелиальных, гладкомышечных клеток и функционирующих кардиомиоцитов. В регенерации поврежденной мышцы сердца могут также участвовать миообласты, мезенхимальные СК КМ, моноциты и клетки боковой популяции крови. Можно считать установленным фактом, что трансплантированные СК КМ способны отвечать на сигнальную регуляцию сердца, мигрировать в место повреждения и давать дифференцированное в нужном направлении потомство. Внутрисердечная трансплантация клеток аутологичного КМ

больным с хронической ишемией миокарда является безопасной и приемлемой процедурой, значительно улучшающей исход лечения больных. Генетическая модификация может повысить выживаемость трансплантированных СК в ишемической ткани сердца.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J. M., et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes // *Nature*. — 2003. — Vol. 425. — P. 968–973.

Angelini P., Markwald R. R. Stem Cell Treatment of the heart // *Tex. Heart. Inst. J.* — 2005. — Vol. 32. — P. 479–88.

Anversa P., Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart // *Circ. Res.* — 1998/ — Vol. 83. — P. 1–14.

Anversa P., Kajstura J., Nadal-Ginard B., et al. Primitive cells and tissue regeneration // *Circ. Res.* — 2003. — Vol. — 92. — P. 579–582.

Anversa P., Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling // *Nature*. — 2002. — Vol. 415. — P. 240–243.

Assmus B., Schachinger V., Teupe C., et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction // *Circulation*. — 2002. — Vol. 106. — P. 3009–3017.

Balsam L. B., Wagers A. J., Christensen J. L., et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium // *Nature*. — 2004. — Vol. 428. — P. 668–673.

Behfar A., Zingman L. V., Hodgson D. M., et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart // *FASEB J.* — 2002. — Vol. 16. — P. 1558–1566.

Bel A., Messas E., Agbulut O., et al. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution // *Circulation*. — 2003. — Vol. 108 (Suppl 1). — P. 247–252.

Beltrami A. P., Urbanek K., Kajstura J., et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction // *New Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344. — P. 1750–1757.

Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D., et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // *Cell*. — 2003. — Vol. 114. — P. 763–776.

Chachques J. C., Acar C., Herreros J., et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application // *Ann. Thorac. Surg.* — 2004. — Vol. 77. — P. 1121–1130.

Charge S. B., Rudnicki M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration // *Physiol. Rev.* — 2004. — Vol. 84. — P. 209–238.

Christman K. L., Vardanian A. J., Fang Q., et al. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculture formation in ischemic myocardium // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2004. — Vol. 44, 3. — P. 654–660.

Dai W., Hale S. L., Martin B. J., et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium. Short- and long-term effects // *Circulation*. — 2005. — Vol. 112. — P. 214–223.

Davani S., Deschaseaux F., Chalmers D., et al. Can stem cells mend a broken heart? // *Cardiovascular Research*. — 2005. — Vol. 65. — P. 305–316.

Davani S., Marandin A., Mersin N., et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model // *Circulation*. — 2003. — Vol. 108, Suppl 1. — P. 253–258.

Dawn B., Stein A. B., Urbanek K., et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2005. — Vol. 102, 10. — P. 3766–3771.

Eisenberg L. M., Kubalak S. W., Eisenberg C. A. Stem cells and the formation of the myocardium in the vertebrate embryo // *Anat. Rec. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* — 2004. — Vol. 276. — P. 2–12.

Eisenberg L. M., Moreno R., Markwald R. R. Multiple stem cell populations contribute to the formation of the myocardium // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2005. — Vol. 1047. — P. 38–49.

Forrester J. S., Price M. J., Makkar R. R. Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians // *Circulation*. — 2003. — Vol. 108. — P. 1139–1145.

Fuchs S., Satler L.F., Kornowski R., et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery diseases: a feasibility study // *J. Am. Col. Cardiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 1721–1724.

Gnecchi M., He H., Liang O.D., et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells // *Nat. Med.* — 2005. — Vol. 11, 4. — P. 367–368.

Goodell M., Rosenzweig M., Kim H., et al. Day efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of 34 antigen exist in multiple species // *Nature. Med.* — 1997. — Vol. 3. — P. 1337–1345.

Guan K., Furst D.O., Wobus A.M. Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation // *Eur. J. Cell. Biol.* — 1999. — Vol. 78. — P. 813–823.

Hagege A.A., Carrion C., Menasche P., et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischemic cardiomyopathy // *Lancet.* — 2003. — Vol. 361. — P. 491–492.

Heng B.C., Haider H.K., Sim E.K., et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro // *Cardiovasc. Res.* — 2004. — Vol. 62, 1. P. 34–42.

Herreros J., Prosper F., Perez A., et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction // *Eur. Heart. J.* — 2003. — Vol. 24, 22. — P. 2012–2020.

Hescheler J., Fleischmann B.K., Leutini S., et al. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis // *Cardiovasc. Res.* — 1997. — Vol. 36. — P. 149–162.

Kajstura J., Leri A., Finato N., et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 1998. — Vol. 95. — P. 8801–8805.

Kang H.J., Kim H.S., Zhang S.Y., et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial // *Lancet.* — 2004. — Vol. 363. P. 751–756.

Kawada H., Fujita J., Kinjo K., et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction // *Blood.* — 2004. — Vol. 104, 12. — P. 3581–3587.

Kessler P.D., Byrne B.J. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications // *Ann. Rev. Physiol.* — 1999. — Vol. 61. — P. 219–242.

Laugwitz K.L., Moretti A., Lam J., et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages // *Nature.* — 2005. — Vol. 433. — P. 647–653.

Li T.S., Hayashi M., Ito H., et al. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta preprogrammed bone marrow stem cells // *Circulation.* — 2005. — Vol. 111, 19. — P. 2438–2445.

Linke A., Muller P., Nurzynska D., et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102, 25. — P. 8966–8971.

Liu J., Hu Q., Wang Z., et al. Autologous stem cell transplantation for myocardial repair // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2004. — Vol. 287, 2. — P. 501–5011.

Maltsev V.A., Rohwedel J., Hescheler J., Wobus A.M. Embryonic stem cells: a model to study structural, atrial and ventricular cell types // *Mech. Dev.* — 1993. — Vol. 44. — P. 41–50.

Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts // *Nature.* — 2004. — Vol. 428. — P. 664–668.

Murry C.E., Wiseman R.W., Schwartz S.M., et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis // *J. Clin. Invest.* — 1996. — Vol. 98. — P. 2512–2523.

Nakamura T., Schneider M.D. The way to a human's heart is through the stomach: visceral endoderm-like cells drive human embryonic stem cells to a cardiac fate // *Circulation.* — 2003. — Vol. 107. — P. 2638–2639.

Ohtsuka M., Takano H., Zou Y., et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization // *FASEB J.* — 2004. — Vol. 18, 7. — P. 851–853.

Perin E. C., Dohmann H. F., Borojevic R., et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure // *Circulation* 2003. — Vol. 107. P. 2294–2302.

Perin E. C., Dohmann H. F., Borojevic R., et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure // *Circulation.* — 2003. — Vol. 107. P. 2294–2302.

Perin E. C., Geng Y. J., Willerson J. T. Adult stem cell therapy in perspective // *Circulation.* — 2003. — Vol. 107. — P. 935–938.

Pfeffer M. A. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction // *Ann. Rev. Med.* — 1995. — Vol. 46. — P. 455–466.

Quaini F., Urbanek K., Beltrami A. P., et al. Chimerism of the transplanted heart // *New Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 346. — P. 5–15.

Reinecke H., Poppa V., Murry C. E. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2002. — Vol. 34. — P. 241–249.

Richards M., Fong C. Y., Chan W. K., et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 20, 9. — P. 933–936.

Sachinidis A., Fleischmann B. K., Kolossov E., et al. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells // *Cardiovasc. Res.* — 2003. — Vol. 58. — P. 278–291.

Sesti Casilda, Hale Sharon L., Lutzko Carolyn., et al. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve contractile reserve of the infarcted left ventricle independent of restoring muscle mass // *J Am Coll Cardiol.* — 2006. — Vol. 41. — P. 1721–1724.

Siminiak T., Kalawski R., Fiszler D., et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up // *Am. Heart. J.* — 2004. — Vol. 148, 3. — P. 531–537.

Smits P. C., van Geuns R. J., Poldermans D., et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2003. — Vol. 42. — P. 2063–2069.

Solloway M. J., Harvey R. P. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective // *Cardiovasc. Res.* — 2003. — Vol. 58. — P. 264–277.

Soonpaa M. H., Koh G. Y., Klug M. G., et al. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium // *Science.* — 1994. — Vol. 264. — P. 98–101.

Stamm C., Westphal B., Kleine H. D., et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration // *Lancet.* — 2003. — Vol. 361. — P. 45–46.

Strauer B. E., Brehm M., Zeus T., et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans // *Circulation.* — 2002. — Vol. 106. — P. 1913–1918.

Tang Y. L., Qian K., Zhang Y. C., et al. Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) treatment // *Regul. Pept.* — 2005. — Vol. 125. — P. 1–8.

Tang Y. L., Zhao Q., Qin X., et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction // *Ann. Thorac. Surg.* — 2005. — Vol. 80, 1. — P. 229–236.

Taylor D. A., Atkins B. Z., Hungspreugs P., et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation // *Nat. Med.* — 1998. — Vol. 4. — P. 929–933.

Terada N., Hamazaki T., Oka M., et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion // *Nature.* — 2002. — Vol. 416. — P. 542–545.

Toma C., Pittenger M.F., Cahill K., et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // *Circulation*. — 2002. — Vol. 105. — P. 93–98.

Tomita S., Li R.K., Weisel R., et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function // *Circulation*. — 1999. — Vol. 100. — P. 11247–11256.

Tomita S., Mickle D.A., Weisel K.D., et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 2002. — Vol. 123. — P. 1132–1140.

Tomoda H., Aoki N. Bone marrow stimulation and left ventricular function in acute myocardial infarction // *Clin. Cardiol.* — 2003. — Vol. 26. — P. 455–457.

Tse H.F., Kwong Y.L., Chan J.K., et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation // *Lancet*. — 2003. — Vol. 361. — P. 47–49.

Urbanek K., Quaini F., Tasca G., et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 10440–10445.

Wang J.S., Shum-Tim D., Chedrawy E., et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 2001. — Vol. 122. — P. 699–705.

Wang J.S., Shum-Tim D., Galipeau J., et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages // *J. Thorac. Surg.* — 2000. — Vol. 120. — P. 999–1006.

Zhang S., Wang D., Estrov Z., et al. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo // *Circulation*. — 2004. — Vol. 110. — P. 3803–3807.

ГЛАВА 18. СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ В РАЗВИТИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

18.1. Регенерация скелетных мышц

Ткань скелетной мышцы взрослого организма состоит из многоядерных сократительных единиц мышечных волокон — симпластов, развивающихся из многоядерных мышечных трубочек. Мышечные волокна окружены базальной пластинкой и сгруппированы в пучки, образующие скелетную мышцу, которая имеет оболочку, сарколемму. Между сарколеммой и базальной пластинкой мышечных волокон локализована популяция мышечных прогениторных клеток, называемых сателлитными клетками, которые обеспечивают регенерацию скелетных мышц [140]. Сателлитные клетки, как типичные СК, обычно пребывают в состоянии покоя, обладают способностью к самообновлению и в ходе дифференцировки образуют новые волокна скелетных мышц. В физиологических условиях каждую неделю замещается только 1–2 % мышечных ядер [Schmalbruch, Lewis, 2000]. После повреждения ткани сателлитные клетки активируются, перемещаются в пределах поврежденной мышцы, пролиферируют и дифференцируются, восстанавливая или замещая поврежденные мышечные волокна (рис. 18.1). Дифференцировка некоторых сателлитных клеток начинается уже при незначительном мышечном повреждении [748].

В мышечной регенерации различают две фазы. Выраженность первой фазы определяется тяжестью повреждения. После повреждения мышцы, вызванного травмой или чрезмерной нагрузкой, некротизированные мышечные волокна освобождают хемокины, что является стимулом для привлечения в пораженный участок воспалительных клеток. Лейкоциты, находящиеся в русле местных сосудов, прилипают к эндотелию, проникают в ткань и мигрируют в зону повреждения [Gute, et al., 1998]. Первичная воспалительная реакция развивается в течение нескольких часов и через 4 дня после повреждения выходит на плато. Затем воспалительная реакция медленно снижается, полностью исчезая только к 14-му дню. Функция воспалительных клеток — фагоцитирование клеточного детрита; в результате их присутствия секретируется ряд цитокинов, инициирующих вторую фазу процесса регенерации.

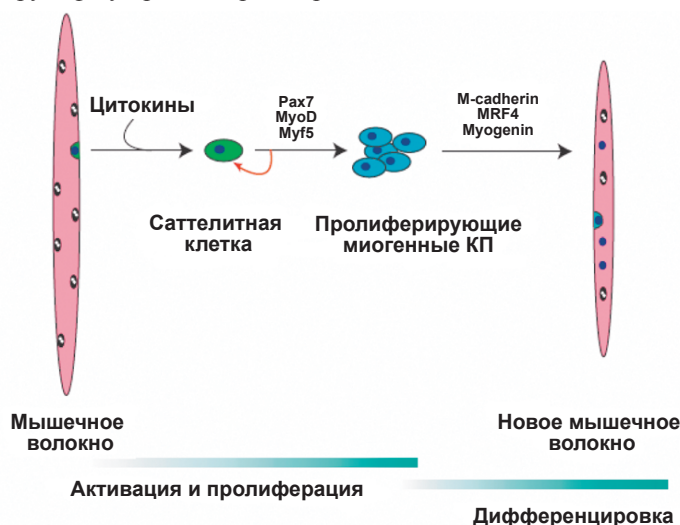


Рис. 18.1. Схема регенерации мышцы с участием сателлитных клеток

Регенерация мышцы после мышечного повреждения характеризуется активацией находящихся в покое сателлитных клеток, расположенных ниже базальной пластинки мышечных волокон. Эта активация частично обусловлена наличием цитокинов, секретируемых воспалительными клетками. Активированные сателлитные клетки образуют пролиферирующие миогенные клетки-предшественники (КП), которые сливаются с образованием новых многоядерных мышечных волокон. По Grenier и Rudnicki [276].

Вторая фаза мышечной регенерации связана с образованием *de novo* мышечных волокон. Она характеризуется активацией и дифференцировкой сателлитных клеток. Во время воспалительной реакции находящиеся в покое сателлитные клетки активируются, проходят через базальную пластинку и мигрируют в место повреждения [Bischoff, 1997]. Здесь они пролиферируют, и их потомки подвергаются множественным циклам деления с образованием новых мышечных клеток, сливающихся с уже имеющимися или новообразованными мышечными волокнами (рис. 18.1).

18.2. Развитие скелетных мышц

Регенерация скелетных мышц у взрослых млекопитающих в какой-то мере повторяет этапы развития мышц в эмбриогенезе. Миогенные предшественники впервые идентифицируются в дерматомиотоме — эпителиальном слое сомита. Эти первые предшественники характеризуются экспрессией транскрипционных факторов Pax3 и Pax7, которые появляются в ответ на сигналы Wnt и Shh, исходящие из нервной трубки, ното хорда и эктодермы [Chen, Goldhamer, 2003]. Значение фактора транскрипции Pax7 в спецификации миогенных клеток показана в работе [Seale, et al., 2000]. У мутантных мышей Pax7^{-/-}, не экспрессирующих Pax7, сателлитные клетки полностью отсутствуют, в связи с чем у взрослых особей развивается тяжелая мышечная атрофия. Предполагают, что примитивные клетки попадают в мышцы с кровотоком; при активации Pax7 эти клетки становятся миогенными СК, а в отсутствие Pax7 они сохраняются как СК, которые под влиянием соответствующего стимула быстро превращаются в кроветворные клетки-предшественники [806].

Следующий этап миогенеза начинается с образования миотома (E9 у мышей) в ответ на активацию bHLH транскрипционных факторов (Myf5 и MyoD). В течение E11-E12 мышечные регуляторные факторы миотома — MRF4 и миогенин приводят к дифференцировке и слиянию первичных Pax3/Pax7-положительных миобластов с образованием первичных (эмбриональных) мышечных волокон [18; Cossu, Biressi, 2005]. Некоторые миобласты не сливаются в первичные мышечные волокна, а продолжают пролиферировать и дифференцироваться до E15-E17, после чего сливаются, формируя вторичные (фетальные) более мелкие мышечные волокна, которые окружают первичные. В это время вокруг каждого мышечного волокна формируется базальная пластинка, после чего сателлитные клетки могут быть морфологически идентифицированы как одноядерные клетки, расположенные между сарколеммой и базальной пластинкой. В период последующего пренатального и постнатального развития мышц сателлитные клетки время от времени делятся, их потомки сливаются с существующими мышечными волокнами, что обеспечивает их рост. Число сателлитных клеток снижается в онтогенезе: при рождении их содержание составляет около 32 %, а затем стабилизируется на уровне 1–5 % [Chen, Goldhamer, 2003]. В конце постнатального роста сателлитные клетки переходят в состояние покоя и могут быть активированы только при повреждении мышцы. При старении частота обнаружения сателлитных клеток уменьшается, что может служить объяснением снижения эффективности мышечной регенерации. Более того, сателлитные клетки старых животных проявляют меньшую пролиферативную активность и способность к слиянию, а также приобретают тенденцию к накоплению липидов [Taylor-Jones, et al., 2002], что также способствует снижению регенеративной способности мышц.

18.3. Стволовые клетки скелетных мышц

Основными претендентами на роль стволовых клеток скелетных мышц являются сателлитные клетки [Cossu, Biressi, 2005; 276; 353]. Активация сателлитных клеток характеризуется повышенным образованием двух главных регуляторных факторов миогенного семейства — Myf5 и MyoD. В нормальных условиях эти факторы экспрессируются в сателлитных клетках на низких уровнях, но экспрессия резко повышается во время активации и последующей пролиферации миогенных клеток-предшественников. Роль MyoD заключается в обеспечении дифференцировки [Sabourin, et al., 1999], тогда как роль Myf5 более сложная и связана с са-

мообновлением сателлитных клеток [Yoshida, et al., 1998]. У трансгенных нокаутных мышей *MyoD*^{-/-} и/или *Myf5*^{-/-} клетки-предшественники скелетных мышц остаются в недифференцированном состоянии [Parker, et al., 2003]. В конце второй фазы регенерации мышц повышается содержание двух других регуляторных факторов — миогенина и MRF4; и клеточный цикл задерживается вследствие гипофосфорилирования белка ретинобластомы (pRb) [Huh, et al., 2004]. В это время образуется ряд белков, способствующих специфической дифференцировке и слиянию миогенных клеток-предшественников. В результате появляются многоядерные клетки, называемые миоцитами или миотрубочками. В ходе последующей дифференцировки миотрубочки продолжают расти путем слияния с соседними миообластами, образуя мышечные волокна. При завершении созревания миотрубочки будут экспрессировать большое количество тяжелых цепей миозина, способного взаимодействовать с вновь синтезированным актином, вызывая сокращение образующегося белка — актомиозина. Межклеточные взаимодействия в этот период обеспечивают трансмембранные белки семейства кадгерина.

При выделении сателлитных клеток из скелетной мышцы и культивировании их *in vitro* они проявляют свойства первичных миобластов: экспрессируют гены *C/EBPα*, *CBFa1*, *MyoD* и *Myf5*, регулирующие адипогенную, остеогенную и миогенную дифференцировку, соответственно [Asakura, et al., 2001; 276; Wada, et al., 2002]. Эти данные свидетельствуют о том, что сателлитные клетки являются не коммитированными клетками-предшественниками, а мультипотентными СК.

У амфибий после ампутации конечностей может наблюдаться дедифференцировка синцитиальных мышечных клеток с развитием из них моонуклеарных клеток [219]. Некоторые данные позволяют предполагать возможность дедифференцировки мышечных клеток также у млекопитающих [Chen, et al., 2004; 545; 754]. В другой работе [Chen et al., 2005] было изучено влияние на скелетные миобласты взрослого человека экзогенного цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) из семейства IL-6, функция которого ограничена, главным образом, нервной системой. Скелетные мышцы, также как нервные клетки, показывают высокую экспрессию рецепторов CNTF, а в денервированной скелетной мышце под влиянием CNTF экспрессия его рецепторов возрастает еще больше [Weiss et al., 1998]. Клонированные миобласты после добавления в культуральную среду экзогенного CNTF индуцируются к дедифференцировке в мультипотентные прогениторные клетки, которые не только пролиферируют на протяжении более 20 пассажей при отсутствии экспрессии специфических факторов *Myf5* и *MyoD*, но также способны дифференцироваться в новые фенотипы, не связанные с мезенхимальным потенциалом: нейроны, клетки глии, гладкомышечные клетки и адипоциты. Было показано, что такое влияние CNTF на судьбу миобластов осуществляется через активацию сигнальных механизмов этих клеток, а именно путей p44/p42 MAPK.

Дополнить наметившуюся тему пластичности клеток скелетных мышц может работа Vourc'h с сотрудниками [Vourc'h, et al., 2004]. В исследовании этих авторов мышечные клетки, экспрессирующие CD90, проявляли способность к образованию нейрональных предшественников и зрелых нейронов. Другие авторы [Alessandri, et al., 2004] из плечелучевой мышцы взрослого человека выделили СК, которые при активации дифференцировки образовывали не только миоциты, но также астроциты и нейроны.

18.4. Миогенные клетки, локализованные вне мышечных волокон

Сателлитные клетки являются главными претендентами в стволовые клетки мышечных волокон в период постнатальной жизни. Они достаточно хорошо охарактеризованы, представляют собой однообразный тип клеток и имеют общего предшественника в эмбриогенезе.

В последние десятилетия в ряде работ описано необычное (неортодоксальное) возникновение мышечных клеток в различных тканях *in vivo* или в условиях *in vitro*. Эти клетки не имели миогенного происхождения и не являлись производными сомитов. Например, спонтанная миогенная дифференцировка клеток мозга была обнаружена в условиях встраивания гена-репортера *LacZ* в *Myf5* локус, что позволило выявить *Myf5*-позитивные клетки в мозгу и показать, что эти

клетки экспрессируют как нейральные, так и мышечные маркеры [Tajbakhsh, et al., 1994]. Хотя физиологическое значение этого факта остается невыясненным, он показывает возможность появления миогенных предшественников в местах, экзогенных по отношению к мышцам.

В нескольких лабораториях было показано, что фибробласты, изолированные из различных органов, способны подвергаться миогенной дифференцировке при трансдукции или сокультивировании их с миогенными клетками [Goldring, et al., 2002; 430, 788]. При этом миогенный потенциал фибробластов зависел от источника ткани. У дермальных фибробластов, трансдуцированных MyoD путем аденовирусного заражения, была выявлена более высокая эффективность миогенной дифференцировки, чем у мышечных фибробластов [430]. Эффективность конверсии определяли в сократительных миотрубочках по активации миоспецифических генов и их слиянию. При культивировании дермальных фибробластов с галектином-1 миогенная конверсия клеток, определяемая по экспрессии десмина, достигала 100 % [Goldring, et al., 2002]. Сейчас мы можем предположить, что за дифференцировку в миогенном направлении ответственны мультипотентные МСК.

Источником миогенных клеток, способных участвовать в регенерации мышц, является КМ. Первое исследование, показавшее возможность образования миоцитов скелетных мышц из клеток КМ, было проведено в конце XX века. Ferrari и др. [237] в качестве доноров КМ использовали трансгенных мышей C57/BlacZ, которые экспрессируют ген репортер β -галактозидазы (β -gal) под промотором легкой цепи миозина, специфической для мышц. Нефракционированные адгезивные или неадгезивные клетки КМ вводили в переднюю большеберцовую мышцу иммунодефицитных мышей спустя 24 часа после повреждения, вызванного введением кардиотоксина. Контрольным животным в поврежденную сходным образом мышцу противоположной конечности вводили 10^5 очищенных сателлитных клеток. Спустя 2–5 недель у 4-х из 6 мышей, которым были введены клетки КМ, в волокнах скелетных мышц обнаружили β -gal-позитивные ядра. После внутривенного введения клеток КМ также отмечали их дифференцировку *in vivo* в мышечные клетки. На основании локализации β -gal-позитивных ядер в мышечных волокнах реципиентов авторы предположили развитие мышечных волокон из клеток КМ.

На моделях мышечной дистрофии Дюшена — трансгенных мышцах mdx и mdx4cv было показано [96; Ferrari, et al., 2001; 286], что клетки КМ при истощении местной популяции сателлитных клеток могут быть индуцированы к дифференцировке в волокна скелетных мышц. У этих мышей отсутствует функционирующий дистрофин. На ранних этапах заболевания мышечную массу поддерживают резидентные сателлитные клетки; однако с течением времени мышцы замещаются соединительной тканью, что приводит к фиброзу и мышечной дистрофии. У самок мышей mdx, которым трансплантировали клетки КМ нормальных самцов, спустя 10 недель выявляли клетки донорского происхождения, содержащие специфические для мышц маркеры — миогенин и Myf5. Значительная часть этих мышечных клеток экспрессировала дистрофин [96].

Другие авторы [LaBarge, Blau, 2002] трансплантировали нефракционированные клетки КМ, меченные зеленым флуоресцентным белком (GFP), облученным реципиентам. Облучение проводилось с целью истощения клеток КМ у реципиентов и снижения содержания сателлитных СК в мышечной ткани. Происходящие из КМ донора GFP-позитивные сателлитные клетки выявлялись в мышечной ткани реципиентов по морфологическим признакам, а также по способности к самообновлению и дифференцировке *in vitro* в миотрубочки. При кариотипировании обнаружили, что «перепрограммированные» клетки были диплоидными. Интересно отметить, что спустя 6 месяцев содержание многоядерных мышечных волокон, происходящих из клеток КМ донора, у реципиентов, подвергавшихся физической нагрузке, было значительно выше, чем у контрольных мышей.

Миогенные клетки-предшественники, содержащиеся в КМ, судя по кинетике включения в регенерацию поперечнополосатой мускулатуры, являются более ранними миогенными предшественниками, чем сателлитные клетки [Сухих, Малайцев, 2001; 237]. Они способны к миграции и по сосудистому руслу достигают поврежденной мышечной ткани [96]. При анализе

приведенных результатов возникает вопрос о природе этих циркулирующих миогенных предшественников и их взаимосвязи с резидентными сателлитными клетками.

Исследования *in vitro* позволили получить клоны с морфологией, типичной для сателлитных клеток, из дорсальной аорты [Cossu, Biressi, 2005; Minasi, et al., 2002], а не из сомитов — предполагаемом источнике всех скелетных миогенных клеток организма. Эти клетки экспрессировали ряд миогенных и эндотелиальных маркеров, которые обнаруживаются также у сателлитных клеток [Guttinger, et al., 2006]. *In vivo* миогенные предшественники, происходящие из аорты, участвовали *in vivo* в регенерации мышц и сливались с резидентными сателлитными клетками. Эти данные позволяют предположить, что субпопуляция постнатальных сателлитных клеток может иметь васкулярное происхождение. С помощью генетического мечения удалось показать, что клоны, экспрессирующие сердечный α -актин могут быть найдены как в миотоме, так и в дорсальной аорте. Более того, на эмбрионах мышей, у которых GFP-ген-репортер был встроен в локус *Pax3*, можно было проследить за миграцией *Pax3*-экспрессирующих клеток из параксиальной мезодермы в дорсальную аорту [Esner, et al., 2006; Minasi, et al., 2002]. Эти данные свидетельствуют о том, что мультипотентные СК дорсальной аорты, экспрессирующие высокие уровни *Pax3*, но не *Pax7*, происходят из параксиальной мезодермы, формируют выстилку аорты и затем используют ангиогенез в качестве вектора для распределения мезодермальных тканей в ходе фетального гистогенеза. На основании этих данных авторы работы [Cossu, Biressi, 2005] предполагают, что при проникновении кровеносного сосуда в мышечный зачаток, эти мультипотентные СК под действием специфического микроокружения приобретают судьбу сателлитных клеток. Когда сосуды внедряются в другие ткани, мультипотентные СК могут адаптироваться, дифференцироваться в клетки этих тканей и участвовать в местном гистогенезе. Такой механизм позволяет объяснить широкое распределение клеток с миогенным потенциалом дифференцировки во многих тканях взрослого организма.

Клетки эмбриональных и постнатальных кровеносных сосудов с миогенным потенциалом дифференцировки в специальной литературе называют «мезоангиобластами». В соответствующих условиях культивирования эти клетки сосудов в течение многих пассажей сохраняют клоногенный рост и способность к мультилинейной дифференцировке в миогенном, остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [Minasi, et al., 2002]. Таким образом, мезоангиобласты проявляют свойства мультипотентных МСК, присутствующих в КМ и во многих, если не во всех, тканях организма. Вместе с тем вопрос, являются клетки из эмбриональных кровеносных сосудов предшественниками МСК или представляют отдельную клеточную линию со сходными свойствами, остается невыясненным.

ГСК, выявляемые в различных анатомических локусах, также демонстрируют миогенный потенциал. Первое исследование в этом направлении носило несколько курьезный характер. Jackson и др. [346] выявили способность клеток, выделенных из скелетных мышц самцов, образовать все главные линии крови после введения облученным самкам. Авторы объяснили полученные результаты трансдифференцировкой миогенных СК, но позднее было установлено, что кроветворные СК, вроде бы происходящие из мышц, на самом деле происходят из ГСК, находящихся в мышцах [684]. В дальнейшем, действительно, было показано, что ГСК с фенотипом $\text{Sca1}^+\text{CD45}^+$ и $\text{Sca1}^+\text{CD34}^+$, локализованные в мышцах, могут вовлекаться в миогенную дифференцировку после мышечного повреждения [276].

В настоящее время наиболее точно идентифицировать гемопоэтические клетки среди других мезодермальных клеток можно на основании экспрессии антигена CD45. Потенциал к миогенной дифференцировке выявили как у CD34-позитивных ГСК, так и CD34-негативных клеток боковой популяции (Side population, SP) КМ. В исследованиях, проведенных как на высокоочищенных ГСК с фенотипом c-kit^+ , Thy1.l^{lo} , Lin^- , Sca-1^+ [682], так и на единичных ГСК [133], были получены убедительные доказательства их прямой (без участия миогенных предшественников) дифференцировки в миоциты, не опосредованной слиянием. Вместе с тем, эффективность миграции и дифференцировки ГСК КМ существенным образом зависела от повреждения. В отсут-

ствие повреждения или воспаления образование миоволокон, содержащих донорские клетки, было незначительным.

Клетки SP КМ с фенотипом CD45⁺, CD34^{-low}, c-kit^{+/low}, Sca-1⁺ также обнаруживались в волокнах скелетных мышц реципиентов [Goodell, et al., 1996; 345; Welm, et al., 2003]. У самок мышей mdx, которым трансплантировали клетки SP КМ самцов, обогащенные ГСК, спустя 12 недель после трансплантации выявляли экспрессию дистрофина у 4 % мышечных волокон и у 10–30 % этих волокон обнаруживались ядра донорского происхождения [286]. В связи с возможностью спонтанной реверсии синтеза нормального дистрофина у мышей mdx, определение одного дистрофина посчитали неубедительным доказательством дифференцировки клеток КМ в функционирующие мышечные волокна. Но у мышей mdx4cv, для которых характерна очень низкая реверсия мышечных волокон (0, 2 %), также было выявлено разрастание клеток КМ в скелетных мышцах с экспрессией в миообластах донорского происхождения нормального дистрофина. Правда, уровень дистрофин-позитивных волокон на протяжении всех 10 месяцев наблюдения был низкий и составлял в среднем 0,25 %, никогда не превышая 1 % [Ferrari, Mavilio, 2002].

Клетки в скелетных мышцах реципиентов, происходящие из клеток КМ донора, могут возникать в результате слияния. Для выяснения этого вопроса авторы работы [Ye et al, 2003] применили систему Cre-Lox. Реципиентами трансплантатов КМ были мыши, имеющие кассету генов (группу tandemно организованных, тесно сцепленных, функционально связанных локусов) *Stop-Lox-β-gal*, которая обеспечивает экспрессию *β-gal* в клетке только при экспрессии фермента Cre рекомбиназы немлекопитающих. Донорами КМ были трансгенные мыши, экспрессирующие Cre на промоторе лизоцима M, который активен преимущественно, но не исключительно, в миелоидных клетках. После трансплантации клеток КМ у реципиентов обнаружили мышечные волокна, экспрессирующие *β-gal*. Эти данные предполагают, что *β-gal*-позитивные симпласты могут возникать путем слияния миелоидной клетки донорского происхождения с предсуществующими мышечными волокнами. Вместе с тем, отсутствие полных данных о клеточной специфичности промотора Lys-M послужило поводом для критических замечаний [283] и не позволило решить вопрос о роли слияния в происхождении клеток скелетных мышц.

На основании приведенных данных можно предположить, что ГСК или МСК, или оба типа этих стволовых клеток могут проникать в мышечные волокна и становиться сателлитными клетками. В пользу этого свидетельствует коэкспрессия маркеров как сателлитных клеток (М-кадгерин, CD34, Pax7), так и трансплантированных клеток КМ донора (GFP, LacZ и др.), локализующихся под базальной пластинкой, но снаружи сарколеммы.

До недавнего времени было практически невозможно в чистом виде выделить фетальные миообласты, а также различные типы стволовых клеток мезодермального происхождения (ГСК, МСК). Поэтому имеется очень мало данных об их общих свойствах и различиях. С внедрением техники генной трансдукции и GFP-мечения удалось получить Myf5-GFP мышей, выделить из них Myf5-позитивные, но недифференцированные, эмбриональные и фетальные миообласты, и сравнить профили экспрессии генов [Kassar-Duchossoy, et al., 2004]. Оказалось, что эти профили у эмбриональных и фетальных миообластов очень схожи, но отличаются от однозначных профилей сателлитных клеток и мезоангиобластов, также имеющих некоторые общие свойства. Даже в условиях *in vitro* эти клетки отличаются по морфологии и ответу на сигнальные молекулы и химические реагенты. Эмбриональные миообласты представляют собой клетки вытянутой формы, которые невозможно сохранить в недифференцированном состоянии — они даже в отсутствие ростовых факторов дифференцируются в миоциты, содержащие одно или несколько ядер. В процессе культивирования они не реагируют на TGFβ и форболовый эфир [Cossu, Biressi, 2005]. Фетальные миообласты характеризуются похожей, но более треугольной формой, могут несколько раз пролиферировать в недифференцированном состоянии. В ответ на ростовые факторы фетальные миообласты дифференцируются в большие многоядерные миоциты, причем эта дифференцировка ингибируется TGFβ и форболовым эфиром. Сателлитные клетки имеют округлую форму, после ограниченного числа пассажей они могут быть подвергнуты индукции

рованной миогенной дифференцировке, чувствительной к TGF β , но не фторболовому эфиру. Наконец, МСК, например, мезоангиобласты, имеют морфологию, сходную с фетальными мио-бластами и сателлитными клетками. Они длительное время могут пролиферировать в недифференцированном состоянии без спонтанной миогенной дифференцировки, которая достигается только сокультивированием с дифференцирующимися миогенными клетками или под влиянием миогенных индуцирующих факторов, например, гидрокортизона в сочетании с сывороткой.

Исследования экспрессии генов показали, что только эмбриональные и фетальные мио-бласты, а также сателлитные клетки экспрессируют миогенные факторы транскрипции bHLH и MEF2. Фетальные миобласты и сателлитные клетки, в отличие от эмбриональных миобластов, экспрессируют высокие уровни VCAM1 и α 7-интегрина. Мезоангиобласты не экспрессируют α 7-интегрин и показывают только минимальное наличие VCAM1. Антиген CD34 экспрессируется мезоангиобластами и сателлитными клетками, но не миобластами.

Приведенные результаты позволяют заключить, что сателлитные клетки и их онтогенетические предшественники, происходящие из сомитов, являются прямыми источниками зрелых мышечных клеток. Мезодермальные стволовые клетки (ГСК, МСК, мезоангиобласты) в нормальных условиях не ориентированы на превращение в миоциты, но в процессе развития или регенерации мышц могут попадать с кровотоком в специфическую нишу или «миогенное поле» и приобретать свойства и функцию мышечных волокон.

18.5. Перспективы клеточной терапии мышечных заболеваний

Применение СК для лечения миопатий имеет высокий терапевтический потенциал. Этот метод предполагает использование клеток, способных восполнить недостаток миогенных волокон и снизить мышечную атрофию. Однако успешного применения СК для лечения мышечных дистрофий и других первичных болезней мышц пока достичь не удастся. Для достижения этой цели необходимо выбрать подходящий тип клеток, обеспечить выживание введенных клеток, а также изучить основные молекулярные механизмы, лежащие в основе индукции миогенной конверсии и дифференцировки СК.

Клеточные препараты, которые могут быть допущены в клинику для терапии мышц, должны соответствовать следующим критериям:

1. — должны быть получены из доступных источников, таких, например, как кровь, КМ, аспираты жировой ткани или биоптаты мышц или кожи;
2. — должны обладать способностью к экспансии, т. е. расти длительное время в культуре в виде гомогенной популяции без потери дифференцировочного потенциала. Выполнение этого требования связано с трудностью однократного получения достаточного количества клеток для эффективного терапевтического применения.
3. — должны достигать места мышечной регенерации в ответ на сигналы цитокинов из очага дистрофии мышц.
4. — должны *in situ* способствовать росту физиологически нормальных мышечных клеток и с высокой эффективностью дифференцироваться в новые мышечные волокна.

Следует отметить, что для эмбриональных и фетальных миобластов, которые могут быть получены в ходе прерывания беременности, до настоящего времени не разработаны протоколы экспансии *in vitro*. Сателлитные клетки отвечают всем вышеперечисленным требованиям, за исключением одного, — они не могут быть доставлены в место поражения с кровотоком, и единственным путем их введения является внутримышечная инъекция. С другой стороны, мезодермальные СК (ГСК, МСК, мезоангиобласты) могут достигать места регенерации с кровотоком. Однако, несмотря на обнадеживающие результаты лечения мышечной дистрофии мышшей при внутриартериальном введении мезоангиобластов [Sampaolesi, et al., 2003], эффективность их применения для лечения первичных миопатий в клинике еще необходимо доказать. Тем не менее, уже сегодня накоплен достаточный экспериментальный материал, позволяющий с оптимизмом рассматривать клеточную терапию в качестве метода лечения мышечных патологий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Малайцев В. В., Богданова И. М., Сухих Г. Т. Современные представления о биологии стволовой клетки // Архив патол. — 2002. — Т. 4. — С 7–11.

Сухих Г. Т., Малайцев В. В. Нейральная стволовая клетка: биология и перспективы нейротрансплантации // БЭБиМ. — 2001. — Т. 131, 3. — С. 244–255.

Alessandri G., Pagano S., Bez A., et al. Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages // Lancet. — 2004. — Vol. 364, 9448. — P. 1872–1883.

Asakura A., Komaki M., Rudnicki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation // Differentiation. — 2001. — Vol. 68. — P. 245–253.

Bischoff R. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells // Dev. Dyn. — 1997. — Vol. 208. — P. 505–515.

Chen J. S. J., Goldhamer D. J. Skeletal muscle stem cells // Reprod. Biol. Endocrinol. — 2003. — Vol. 13, 1. — P. 101–108.

Chen S., Zhang Q., Wu X., et al. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule // J. Am. Chem. Soc. — 2004. — Vol. 126. — P. 410–411.

Chen X., Mao Z., Liu S., et al. Dedifferentiation of adult human myoblasts induced by ciliary neurotrophic factor in vitro // Mol. Biol. Cell. — 2005. — Vol. 16. — P. 3140–3151.

Cossu G., Biressi S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration // Semin. Cell Develop. Biol. — 2005. — Vol. 16. — P. 623–631.

Esner M., Meilhac S. M., Relaix F., et al. Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome // Development. — 2006. — Vol. 133, 4. — P. 737–749.

Ferrari G., Mavilio F. Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? // Neuromuscul. Disord. — 2002. — Vol. 12. — P. S7–S10.

Ferrari G., Stornaiuolo A., Mavilio F. Failure to correct murine muscular dystrophy // Nature. — 2001. — Vol. 411. — P. 1014–1015.

Goldring K., Jones G. E., Sewry C. A., et al. The muscle-specific marker desmin is expressed in a proportion of human dermal fibroblasts after their exposure to galectin-1 // Neuromuscul. Disord. — 2002. — Vol. 12. — P. 183–186.

Goodell M. A., Brose K., Paradis G., et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo // J. Exp. Med. — 1996. — Vol. 183. — P. 1797–1806.

Gute D. C., Ishida T., Yarimizu K., et al. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle // Mol. Cell. Biochem. — 1998. — Vol. 179. — P. 169–187.

Guttinger M., Taft E., Battaglia M., et al. Allogeneic mesoangioblasts give rise to alpha-sarcoglycan expressing fibers when transplanted into dystrophic mice // Exp. Cell. Res. — 2006. — Vol. 312, 19. — P. 3872–3879.

Huh M. S., Parker M. H., Scime A., et al. Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation // J. Cell. Biol. — 2004. — Vol. 166. — P. 865–876.

Kassar-Duchossoy L., Gayraud-Morel B., Gomes D., et al. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5: Myod double-mutant mice // Nature. — 2004. — Vol. 431. — P. 466–471.

LaBarge M. A., Blau H. M. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury // Cell. — 2002. — Vol. 111. — P. 589–601.

Minasi M. G., Riminucci M., De Angelis L., et al. The meso-angioblast: a multi-potent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues // Development. — 2002. — Vol. 129. — P. 2773–2783.

Parker M. H., Seale P., Rudnicki M. A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis // Nat. Rev. Genet. — 2003. — Vol. 4. — P. 497–507.

Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Seale P., et al. Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle // *J. Cell. Biol.* — 1999. — Vol. 144. — P. 631–643.

Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A., et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts // *Science*. — 2003. — Vol. 301, 5632. — P. 487–492.

Schmalbruch H., Lewis D.M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles // *Muscle Nerve*. — 2000. — Vol. 23. — P. 617–626.

Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells // *Cell*. — 2000. — Vol. 102, 6. — P. 777–786.

Tajbakhsh S., Vivarelli G., Cusella-De Angelis M.G., et al. A population of myogenic cells derived from the mouse neural tube // *Neuron*. — 1994. — Vol. 13. — P. 813–821.

Taylor-Jones J.M., McGehee R.E., Rando T.A., et al. Activation of an adipogenic program in adult myoblasts with age // *Mech. Ageing Dev.* — 2002. — Vol. 123. — P. 649–661.

Vourc'h P., Romero-Ramos M., Chivatakarn O., et al. Isolation and characterization of cells with neurogenic potential from adult skeletal muscle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — Vol. 317, 3. — P. 893–901.

Wada M.R., Inagawa-Ogashiwa M., Shimizu S., et al. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells // *Development*. — 2002. — Vol. 129. — P. 2987–2995.

Weiss S., Lie D.C., Ragoss U., et al. Increased expression of CNTF receptor alpha in demervated human skeletal muscle // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* — 1998. — Vol. 57. — P. 850–857.

Welm B., Behbod F., Goodell M.A., et al. Isolation and characterization of functional mammary gland stem cell // *Cell Prolif.* — 2003. — Vol. 36, Suppl. 1. — P. 17–32.

Ye M., Iwasaki H., Laiosa C.V., et al. Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term multilineage repopulation potential // *Immunity*. — 2003. — Vol. 19. — P. 689–699.

Yoshida N., Yoshida S., Koishi K. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells' // *J. Cell. Sci.* — 1998. — Vol. 111. — P. 769–779.

ГЛАВА 19. ОТ МЕЗЕНХИМАЛЬНОЙ СТЕЛОВОЙ КЛЕТКИ ДО ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

19.1. Мезенхимальная стеловая клетка как исходная клетка остеопоза

Кость представляет собой динамичную, хорошо васкуляризованную ткань, обладающую уникальной способностью восстановления и ремоделирования без образования рубцов. Это обеспечивает механическую стабильность скелета, необходимую для движения, физических нагрузок, защиты внутренних органов. Кроме того, кость служит резервуаром для ионов кальция в организме, способным к их быстрой мобилизации для поддержания кальциевого гомеостаза крови.

Клетки костной ткани (преостеобласты, остеобласты, остециты и остеокласты) располагаются в сложном матриксе, включающем минеральный (гидроксиапатиты) и органический компоненты. Органический компонент костного матрикса на 90% состоит из коллагена типа I, а оставшиеся 10% составляют неколлагеновые белки (остеокальцин, остеонектин, костный сиалопротеин и протеогликаны). Неколлагеновые белки участвуют в развитии, минерализации и регуляции функциональной активности клеток костной ткани.

Примитивная костная строма возникает в онтогенезе в результате сложных процессов, которые происходят вслед за дифференцировкой примитивных остеогенных клеток, формированием первичной кости и вторжением в нее сосудов. Пионером изучения остеогенного потенциала клеток стромы КМ был А. Я. Фриденштейн. В 70-е годы XX столетия он получил однородную культуру мультипотентных клеток стромы КМ, адгезированных к подложке, которые отличались высокой способностью к самообновлению, не подвергаясь дифференцировке. В соответствующих условиях культивирования стромальные клетки превращались в костную, жировую, хрящевую, мышечную или соединительную ткань. В последующие годы работами исследовательских коллективов, руководимыми А. Я. Фриденштейном [243-250] и G. K. Owens [565-567], была установлена основная роль МСК в качестве клетки, которая под влиянием активных в образовании кости цитокинов начинает дифференцировку по пути остеопоза. Термин «остеопоз» применяется для обозначения процесса развития клеток кости из МСК, тогда как термином «остеогенез» предлагают обозначать образование зрелыми остеобластами минерализованного костного матрикса [Long, 2001]. В настоящее время считается общепризнанной клональная иерархическая модель развития МСК, устанавливающая происхождение различных тканей, находящихся в тесном контакте во время формирования и роста органов, из единого предшественника [Kneser, et al., 2006; 528]. Такая пластичность клеток в пределах одного органа или ткани получила название «ортодоксальной» пластичности. В процессе ее может произойти образование двух или трех мезенхимальных линий, конечным исходом одной из которых может быть клетка кости [593].

Процесс развития клеток, предшествующих появлению клеток кости, можно разделить на ряд стадий (рис. 19.1.): мультипотентные МСК, образующие все типы клеток мезодермальных тканей; трипотентные МСК, образующие костную, хрящевую и жировую ткани; бипотентные МСК, образующие кость и хрящ (остеохондральные предшественники); остеопрогениторные клетки, преостеобласты, остеобласты. При этом следует иметь в виду, что все эти клетки, находясь в непрерывном развитии, не имеют между собой каких-либо границ и обособлений, вследствие чего возникают противоречия в терминологии.

19.2. Остеопрогениторные клетки

Остеопрогениторные клетки от МСК отличаются отсутствием способности самообновляться. Эти клетки уже проявляют специфическую коммитированность. Они обеспечивают экспансию остеобластов и пролиферируют под влиянием множества митотических ростовых факторов. На основании работ, проведенных *in vitro* и *in vivo* на грызунах, установили, что остеопрогениторные клетки можно обнаружить среди адгезивных клеток КМ, образующих колонии фибробла-

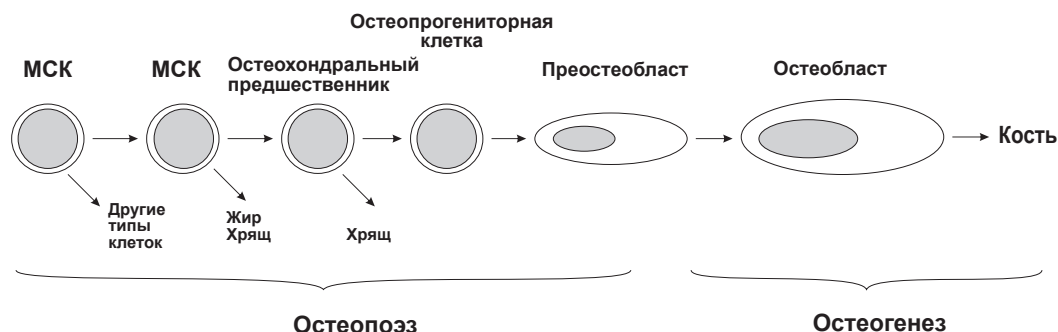


Рис. 19.1. Развитие клеток кости

Развитие клеток кости из МСК (остеопозз) включает ряд стадий, на каждой из которых снижается дифференцировочный потенциал МСК от мультипотентного до унипотентного (остеопрогениторная клетка). На следующих стадиях (остеогенез) происходит образование минерализованного костного матрикса в результате окончательной дифференцировки остеобластов.

стоподобных клеток (ФБПК) [244, 246, 249, Luria, et al., 1987, 566]. Но в культуре колониеобразующие (CFU-f) клетки представляют гетерогенную популяцию потомков, из которых только некоторые имеют выраженный остеогенный потенциал [246; 566]. При культивировании клеток колоний в среде, индуцирующей остеогенез, клетки-предшественники кости можно выявить по образованию минерализованных очагов развития костных клеток [Long, 2001]. В формировании минерализованных очагов принимают участие не только остеопрогениторные клетки, но и другие адгезивные и неадгезивные клетки КМ, которые создают необходимый фонд поддерживающих клеток. Их значение сохраняется до тех пор, пока не будет достигнута высокая плотность остеопрогениторных клеток. С помощью моноклональных антител к щелочной фосфатазе (ЩФ, ALP) из суспензии клеток костных узлов выделили активную в плане образования минерализованных очагов ALP-позитивную фракцию. В то же время в ALP-негативной фракции выявили наличие большого числа клеток, чувствительных к дексаметазону. В связи с этим авторы работы [Turksen, Aubin, 1991] заключили, что в ALP-негативной фракции содержатся более примитивные остеопрогениторные клетки, нуждающиеся в стимуляции дексаметазоном дифференцировки.

Работы на клетках человека подтвердили и расширили наблюдения, сделанные на клетках грызунов. Культуры остеопрогениторных клеток человека были получены как из адгезивных [Nishida, et al., 1999; Oreffo, et al., 1999], так и неадгезивных [Long, et al., 1995; Oyajobi, et al., 1999] субпопуляций КМ, но взаимосвязь этих двух фенотипов остается не выясненной. Эти исследования подтвердили необходимость присутствия поддерживающих клеток для реализации остеогенной дифференцировки остеопрогениторных клеток. Также было установлено, что при отсутствии остеопозитических добавочных клеток КМ в ранние фазы остеопоза клетки-предшественники кости человека погибают, несмотря на наличие множества цитокинов, активных в отношении кости. Предполагают, что остеопозитические добавочные клетки образуют растворимый регулятор, который благотворно влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников кости человека. Параллельно было обнаружено, что содержание остеопрогениторных клеток резко снижается с возрастом и при остеопорозе [Nishida, et al., 1999].

Остеопрогениторные клетки человека характеризуются высокой гетерогенностью. Они представлены субпопуляциями, отличающимися как по фенотипу [124; Eipers, et al., 2000; Gronthos, et al., 1999; Long, et al., 1995], так и по реакции на ростовые факторы [Erdmann, et al., 1999; Long, et al., 1995]. Важно, что остеопрогениторные клетки, происходящие из КМ человека, не содержат CD34 маркера кроветворных клеток [Long, et al., 1995]. В лаборатории Long [Eipers, et al., 2000; Long, et al., 1995] были идентифицированы два класса зрелых остеопрогениторных клеток

человека, отличающиеся по пролиферативному потенциалу и реакциям на стимулы. Следует отметить, что в этой лаборатории проводили тщательную селекцию исследуемых популяций, достигая ~ 5000-кратной очистки клеток-предшественников кости.

19.3. Преостеобласты

Преостеобласты представляют переходное состояние между активно пролиферирующими остеогенными предшественниками и зрелыми остеобластами. При культивировании *ex vivo* в условиях трехпространственного роста (3-D) преостеобласты способны образовать микрокристаллы кости человека [Kale, et al., 2000]. Преостеобласты выявляются преимущественно морфологически на основании локализации по соседству с активными остеобластами (в срезах ткани или *in vitro*) [Dunlop, Hall, 1995]. Преостеобласты экспрессируют низкие уровни белков костных клеток, таких как ЦФ, остеонектин, остеопонтин и др. [Butler, 1989; Gronthos, et al., 1999; Long, et al., 1995] и окрашиваются моноклональным антителом Stro-1 [Gronthos, et al.]. Исследования, проведенные на клетках грызунов, позволили получить важную информацию, характеризующую преостеобласты, их реакции на ростовые факторы, сигнальную трансдукцию и минерализацию [124; McCauley, et al., 1996; Xiao, et al., 2000]. У преостеобластов, также как у остеогенных клеток, с возрастом выявляют отчетливые изменения в экспрессии таких белков кости, как остеонектин, остеопонтин и остеокальцин [Fedarko, et al., 1992]. При стимуляции TGF- β 1 преостеобласты становятся не отличимыми от остеобластоподобных клеток по размерам, морфологическим признакам, внутренней структуре и экспрессии антигенов [Long, et al., 1995]. Кроме TGF- β , в развитии кости участвуют также другие факторы роста и цитокины, среди которых по значению выделяются инсулиноподобные факторы роста (IGF), bFGF и морфогенетические белки кости (BMP). Важно отметить, что синтез остеобластами IGF нарушается при постменопаузном остеопорозе и снижается при низкокалорийной диете.

19.4. Механизмы регуляции развития кости

Исследования механизмов остеопоза и остеогенеза позволили установить, что факторы транскрипции регулируют экспрессию или сохранение остеофенотипа, а гены гомеобокса, расположенные в 3' концевых частях регуляторных генов, имеют большое значение в контроле образования скелета.

Факторы транскрипции — ядерные белки, регулирующие состояние активности генов, обеспечивают линейноспецифическую дифференцировку. Показано, что в клетках костной линии фактор транскрипции Cbfa1 играет важную роль в сохранении остеофенотипа [Lian, et al., 1998], хотя истинный мастер-ген* еще не идентифицирован. Cbfa1 является первым специфическим для остеобластов фактором транскрипции. Он экспрессируется в мезенхимальных клетках, которые развиваются в хондроциты или остеобласты [Centrella, et al., 1987]. Гаплонедостаточность Cbfa1 у мышей мутантов обуславливает аномальное развитие скелета, а у человека с мутацией Cbfa1 обнаруживается синдром врожденной дисплазии [Mundlos, et al., 1997]. У гомозиготных Cbfa1-нуль мышей выявляют нормальное строение скелета, но он состоит из хрящевой ткани, так как у этих животных отсутствует способность остеобластов к дифференцировке [Otto, et al., 1997]. TWIST — основной транскрипционный фактор симметричного элемента ДНК (спираль-петля-спираль) некоторых регуляторных белков — также экспрессирован в преостеобластах и повышается под влиянием FGF. Другой фактор транскрипции Id, подавляющий элементы спираль-петля-спираль, регулируется BMP-2. Предполагают, что эти два фактора транскрипции и названные цитокины могут быть частью единого регуляторного цикла.

Ген гомеобокса Msx2 также участвует в функции остеопрогениторных клеток. Он главным образом экспрессирован в пролиферирующих клетках костной линии (т.е. в остеопрогенитарных клетках и преостеобластах). У мышей, дефицитных по Msx2, отмечают задержку оссифи-

* Мастер-ген, или основной ген, это ген, имеющий четко определенное фенотипическое выражение, т.е. кодирующий определенный качественный признак.

кации костей черепа. Фактор транскрипции *Varx1* играет роль в конденсации хондроцитов и костей основания черепа. Наконец, *Dlx5*, который экспрессирован только в остеобластах, является единственным фактором транскрипции, различающим остеобласты в стадии минерализации. Он, следовательно, противоположен по значению *Msx2*. Несомненную роль в сохранении фенотипа остеобластов имеют также молекулы сигнальной трансдукции [Long, et al., 2001].

19.5. Развитие пространственной структуры костной ткани

Для нормального развития кости необходимо согласованное действие ряда сигналов микроокружения: цитокинов, факторов роста, молекул ЭКМ и межклеточных взаимодействий [Lian, Stein, 1992]. Такие регуляторные сигналы, экспрессированные во времени и пространстве, обеспечивают в результате развитие микроокружения, которое способствует трехмерному росту кости [Long, et al., 2001]. Конденсация клеток имеет важное значение во время скелетообразования, влияя как на хондрогенез, так и остеогенез [Dunlop, Hall, 1995]. В процессе остеогенеза конденсация преosteобластов предшествует дифференцировке остеобластов и минерализации матрикса.

Во время пренатального остеогенеза примордиальные клетки дифференцируются в преosteобласты, которые подвергаются затем конденсации, предшествующей остеофикации [Ducy, et al., 2000]. Остеогенные клетки, происходящие из черепа или КМ, растущие *in vitro* на плоской поверхности (двухмерный матрикс, 2-D), постепенно достигают сливного роста. В результате повышения плотности клеток появляются «костные узелки», т. е. клеточные образования, оказывающиеся в условиях трехмерного (3-D) роста, которые способствуют минерализации окружающего ЭКМ [Malaval, et al., 1994]. Такая последовательность событий подтверждается наблюдением, что обработка TGF- β 1 клеток костей человека из разных источников, растущих в бессывороточной среде, приводит к образованию сферических трехмерных клеточных скоплений (сфероидов костных клеток) и стимуляции образования белков кости [Kale, et al., 2000]. Эти сфероиды при достижении соответствующей плотности клеток образуют кристаллические структуры (микроспикулы), состоящие из организованной кости человека.

Наилучшие результаты наблюдали при остеогенезе в пористых керамических имплантатах [Meyer, Wiesmann, 2006; 594]. Более ранние эксперименты с применением диффузионных камер, в которые помещались культивированные клетки КМ, часто приводили к получению фиброзной ткани, но не кости или хряща. Положение изменилось с началом применения пористых керамических материалов, впервые предложенных Ohgushi и Caplan [552]. Эти материалы, состоящие из гидроксиапатитов, подобных имеющимся в составе нормальной кости, после подкожной имплантации обеспечивали получение кости из клеток, происходящих из КМ. Было установлено, что МСК человека могут подвергаться свыше 35 популяционным делениям, прежде чем уменьшится скорость их пролиферации и появятся признаки клеточного старения. Все данные свидетельствуют, что потенциал новообразованных клеток кости сохраняется на протяжении всей жизни реципиента [594]. Для проверки *in vivo* возможности заживления дефектов кости этим методом Bruder и др. [126] удалили у тимус-эктомированной крысы часть бедра и имплантировали ей керамический носитель, наполненный МСК человека. Быстрое образование кости на месте дефекта ткани выявили рентгеновским исследованием. Заживление продолжалось в течение 8-12 недель, после которых создание новой кости подтвердилось гистологическими методами.

19.6. Клеточная терапия заболеваний костной системы

После внутривенного введения КМ мышей самцов необлученным самкам обнаружили его способность содействовать, хотя и с невысокой частотой, образованию длинных костей [286]. Разросшиеся клетки образовывали кость, прежде чем дифференцироваться в конечном итоге в остециты. Ноу и сотр. [Ноу, et al., 1999] использовали остеобластную специфичность промотора остеокальцина для ограничения экспрессии специфических генов в костной ткани. Они трансплантировали мышам внутривенно адгезивные клетки КМ, содержащие ген про-

мотор, и затем обнаруживали их наличие в различных тканях организма, тогда как экспрессия трансгена была выявлена только в остеобластах и остеоцитах. Эта методика получила большие преимущества при использовании в клинике с терапевтической целью. Так, трем младенцам, больным врожденной хрупкостью костей (*osteogenesis imperfectum*), вызванной дисбалансом остеобластов в костной ткани, после разрушения их КМ вводили трансплантаты КМ здоровых доноров. Спустя 3 месяца у всех детей обнаружили улучшение показателей минерального состава костей по всему телу, сопровождающееся стимуляцией их роста и уменьшением числа переломов [327].

Хотя усилия исследователей в области биоинженерии кости получили в последние годы большое развитие, клиническая тканевая инженерия костной ткани уступает в этом плане инженерии хрящевой ткани [Meyer, Wiesmann, 2006]. В то же время мировой рынок замещения кости и восстановительных приемов оценивается примерно в 300 млн евро (Concord Corporate Finance Research). В настоящее время в клинической практике предпочтительными заменителями кости являются синтетические костные материалы, а также ксеногенные, аллогенные или аутологичные трансплантаты. Однако в будущем с улучшением технологии тканевой инженерии применение *ex vivo* выращенной костной ткани сможет обеспечить значительную часть потребностей мирового рынка замещения кости.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Butler W.T. The nature and significance of osteopontin // *Connect. Tissue Res.* — 1989. — Vol. 23. — P. 123–136.

Centrella M., McCarthy T.L., Canalis E. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone // *J. Biol. Chem.* — 1987. — Vol. 262. — P. 2869–2874.

Ducy P., Schinke T., Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance // *Science.* — 2000. — Vol. 289. — P. 1501–1504.

Dunlop L.L., Hall B.K. Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis // *Int. J. Dev. Biol.* — 1995. — Vol. 39. — P. 357–371.

Eipers P.G., Kale S., Taichman R.S., et al. Bone marrow accessory cells regulate human bone precursor cell development // *Exp. Hematol.* — 2000. — Vol. 28. — P. 815–825.

Erdmann J., Kogler C., Diel I., et al. Age-associated changes in the stimulatory effect of transforming growth factor β on human osteogenic colony formation // *Mech. Ageing Dev.* — 1999. — Vol. 110. — P. 73–85.

Fedarko N.S., Vetter U.K., Weinstein S., et al. Age-related changes in hyaluronan, proteoglycan, collagen, and osteonectin synthesis by human bone cells // *J. Cell. Physiol.* — 1992. — Vol. 151. — P. 215–227.

Gronthos S., Zannettino A.C., Graves S.E., et al. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells // *J. Bone Miner. Res.* — 1999. — Vol. 14. — P. 47–56.

Hou Z., Nguyen Q., Frenkel B., et al. Osteoblast-specific gene expression after transplantation of marrow cells: implications for skeletal gene therapy *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — Vol. 96. — P. 727–729.

Kale S., Biermann S., Edwards C., et al. Three-dimensional cellular development is essential for the *ex vivo* formation of human bone // *Nat. Biotech.* — 2000. — Vol. 18. — P. 954–958.

Kneser U., Schaefer D.J., Polykandriotis E., Horch R.E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view // *J. Cell. Mol. Med.* — 2006. — Vol. 10, 1. — P. 7–19.

Lian J.B., Stein G.S. Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* — 1992. — Vol. 3. — P. 269–305.

- Lian J.B., Stein G.S., Stein J.L., et al.* Osteocalcin gene promoter: Unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation // *J. Cell. Biochem.* — 1998. — Vol. 30-31. — P. 62–72.
- Long M.W., Robinson J.A., Ashcraft E.A., et al.* Regulation of human bone marrow— derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors // *J. Clin. Invest.* — 1995. — Vol. 95. — P. 881–887.
- Long M.W.* Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells // *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* — 2001. — Vol. 27, 3. — P. 677–690.
- Luria E.A., Owen M.E., Friedenstein A.J., et al.* Bone formation in organ cultures of bone marrow // *Cell Tissue Res.* — 1987. — Vol. 248. — P. 449–454.
- Malaval L., Modrowski D., Gupta A.K., et al.* Cellular expression of bonerelated proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures // *J. Cell. Physiol.* — 1994. — Vol. 158. — P. 555–572.
- McCauley L.K., Koh A.J., Beecher C.A., et al.* PTH/ PTHrP receptor is temporally regulated during osteoblast differentiation and is associated with collagen synthesis // *J. Cell. Biochem.* — 1996. — Vol. 61. — P. 638–647.
- Meyer U., Wiesmann H.P.* Bone and Cartilage Engineering. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 2006. — 264 p.
- Mundlos S., Otto F., Mundlos C., et al.* Mutations involving the transcription factor BFA1 cause cleidocranial dysplasia // *Cell.* — 1997. — Vol. 89. — P. 773–779.
- Nishida S., Endo N., Yamagiwa H., et al.* Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation // *J. Bone Miner. Metab.* — 1999. — Vol. 17. — P. 171–177.
- Oreffo R.O., Romberg S., Viridi A.S., et al.* Effects of interferon alpha on human osteoprogenitor cell growth and differentiation in vitro // *J. Cell. Biochem.* — 1999. — Vol. 74. — P. 372–385.
- Otto F., Thornell AP., Crompton T., et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development // *Cell.* — 1997. — Vol. 89. — P. 765–771.
- Oyajobi B.O., Lomri A., Hott M., et al.* Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody // *J. Bone Miner. Res.* — 1999. — Vol. 14. — P. 351–361.
- Turksen K., Aubin J. E.* Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells // *J. Cell. Biochem.* — 1991. — Vol. 114. — P. 373–384.
- Xiao G., Jiang D., Thomas P., et al.* MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1 // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 4453–4459.

ГЛАВА 20. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В РАЗВИТИИ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ, СУХОЖИЛИЙ И СВЯЗОК

20.1. Развитие и свойства хрящевой ткани

Хрящ представляет собой разновидность соединительной ткани, которая или является частью кости, обеспечивающей ей рост и подвижность, или представляет отдельное анатомическое образование вне скелета. В процессе развития и роста млекопитающих образуется три типа хряща: гиалиновый хрящ с прозрачным матриксом, как бы прошитым белыми волокнами; эластический хрящ с желтыми эластическими волокнами в матриксе; и волокнистый хрящ, в котором матрикс представлен плотной белой волокнистой соединительной тканью [Павлова и др., 1988]. Эластический хрящ образует хрящевую часть ушных раковин, слуховую (евстахиеву) трубу, надгортанник и хрящевые пластинки гортани. Из волокнистого хряща состоят межпозвоночные диски, мениски в некоторых суставах и ряд суставных хрящей; он образует также лонное сращение, края суставных ямок и выстилает места прикрепления сухожилий к костям. Гиалиновый хрящ — наиболее распространенный тип хряща, который обладает высокой чувствительностью к действию различных повреждающих факторов. Он является основой хрящевых структур носа, ребер, глотки, трахеи и бронхов, ростовых пластинок длинных костей и суставных поверхностей суставов. Ростовые пластинки ответственны за процесс, обеспечивающий удлинение конечностей и рост костей в ходе пренатального и постнатального развития. Этот тип роста костей включает многостадийные процессы созревания хондроцитов и эндохондральной оссификации [Hunziker, 1994]. Гиалиновый хрящ почти целиком формирует скелет зародыша, но затем в процессе развития везде замещается костной тканью, за исключением суставных поверхностей, где сохраняется как суставный хрящ.

В эмбриогенезе хондрогенез начинается с агрегации и конденсации неоформленной мезенхимы. Известно, что ключевую роль в процессах компактизации и конденсации мезенхимальных клеток играют BMP [Barna, Niswander, 2007]. Основные стадии хондрогенеза показаны на рис. 20.1. На самом раннем этапе хондрогенеза пролиферирующие хондробласты и незрелые хондроциты экспрессируют ряд белков ЭКМ и молекул адгезии, таких как форма II коллагена типа II (Col2a), агрекан, N-кадгерин, тенасцин C и другие, а также транскрипционный фактор Sox9 [Zuscik, et al., 2008]. На следующей стадии дифференцировки хондроциты быстро пролиферируют, увеличивая хрящевые участки формирующегося скелета. Затем клетки, локализованные в центре растущего хряща, выходят из клеточного цикла, иницируя процесс гипертрофической дифференцировки. На этой стадии хондроциты увеличиваются в размерах, окончательно дифференцируются, минерализуются и подвергаются апоптозу. После гибели и деградаци хондроцитов сформированный ими ЭКМ используется в качестве матрицы для последующего отложения солей, формирования кости, заселения ее остеобластами и остеокластами. Одновременно деградирующий хрящ подвергается васкуляризации ближайшими кровеносными сосудами для формирования полости костного мозга.

Хрящи ростовых пластинок, локализованных на концах развивающихся длинных костей, также образуются в результате последовательных процессов пролиферации, дифференцировки и гибели хондроцитов [Hunziker, 1994]. По мере развития этих процессов в хряще различают несколько зон с характерными молекулярными и морфологическими признаками. Клетки плода, расположенные возле дистальной зоны хряща, так называемые периартикулярные хондроциты, характеризуются округлой формой и экспрессируют ранние маркеры хондрогенной дифференцировки, такие как Sox9, Col2a1(Ib), агрекан I и низкий уровень рецепторов FGF 3 (Fgfr3), а также белки сигнальной системы Hedgehog, в частности, Indian hedgehog (Ihh). В процессе пролиферации и на ранних стадиях созревания хондроциты уплощаются и образуют ряды клеток, расположенные параллельно оси продольного роста. Эти уплощенные столбчатые хондроциты характеризуются максимальной пролиферативной активностью среди клеток хрящевого элемента. Они экспрессируют низкие уровни факторов Runx2 и Osterix и высокие уровни Fgfr3, NKx3, 2 и Ptc1.

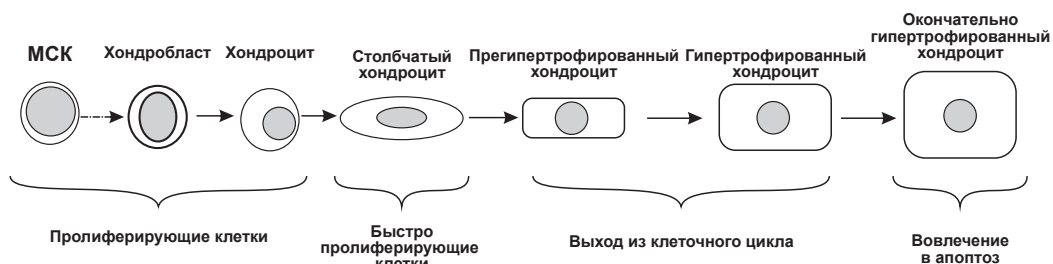


Рис. 20.1. Развитие клеток хряща из мезенхимы (хондрогенез)

Развитие клеток хряща из МСК (хондрогенез) включает ряд стадий. Унипотентные хондробласты и незрелые хондроциты пролиферируют и экспрессируют белки ЭКМ и молекулы адгезии: Col2a1(IIf), аггрекан, N-кадгерин, N-CAM, тенасцин С, Fgfr3, а также транскрипционный фактор Sox9. В процессе созревания хондроциты уплощаются и образуют столбчатые хондроциты, которые характеризуются низкими уровнями Runx2 и Osterix (Osx) и высокими уровнями Fgfr3, Nkx3.2 и Ptc1. Столбчатые хондроциты гипертрофируются, превращаясь в прегипертрофированные хондроциты, перестают делиться и начинают экспрессировать Ihh, PTHrP-R, ALP, транскрипционные факторы Runx2 и Osx. При последующей гипертрофии прегипертрофированные хондроциты превращаются в гипертрофические хондроциты, которые образуют минерализованный матрикс. В них повышается экспрессия Col10a1, Runx2 и начинает экспрессироваться VEGF. Окончательно гипертрофированные хондроциты экспрессируют Mmp13, VEGF, Col10a1 и затем подвергаются апоптозу. По материалам работы [Zuscik, et al., 2008].

В дальнейшем столбчатые хондроциты начинают гипертрофироваться (прегипертрофированные хондроциты) и перестают делиться. Прегипертрофированные хондроциты увеличиваются в размерах и начинают экспрессировать Ihh, белковые рецепторы паратиреоидного гормона (PTHrP-R) и щелочную фосфатазу (ЩФ; ALP), а также транскрипционные факторы Runx2 и Osx, важные для дифференцировки хондроцитов и минерализации хряща [Barna, Niswander, 2007].

По мере гипертрофии клетки продолжают увеличиваться в размерах, образуют минерализованный матрикс, в них повышается экспрессия коллагена типа X (Col10a1), Runx2 и нескольких других ростовых факторов, индуцирующих дифференцировку в остеогенном направлении. Как гипертрофированные, так и конечные гипертрофированные хондроциты экспрессируют высокие уровни VEGF, который, вероятно, участвует в васкуляризации хряща. Конечные гипертрофированные хондроциты экспрессируют Mmp13 — фермент, контролирующий деградацию матрикса, предшествующую минерализации и формированию костномозговой полости.

В ранние сроки после рождения эпифизарные хондроциты (незрелые хондроциты, локализованные в центре эпифизов длинных костей) подвергаются созреванию, которое происходит по описанной выше схеме скелетогенеза, характерной для эмбрионального развития. Эпифизарные хондроциты дифференцируются, гипертрофируются, подвергаются апоптозу и замещаются кровеносными сосудами и остеобластами, создающими вторичные центры окостенения. Эти центры разделяют два конгломерата сохранившегося хряща внутри длинных костей взрослого скелета: суставный хрящ и зрелый хрящ ростовой пластинки. Во взрослом организме с полностью сформированным скелетом хондрогенез и созревание хондроцитов, наблюдаемые, например, при репарации переломов, происходят без образования вторичных центров оксификации. В этом случае тот же процесс гипертрофии хондроцитов служит лишь для инициации минерализации и индукции васкуляризации костномозговой полости [Hunziker, 2002].

Развитие суставного хряща начинается в эмбриогенезе в месте формирования синовиального сустава. Показано, что суставные хондроциты образуются из клеток интерзоны, однако механизмы их формирования, роста и поддержания после рождения остаются малоизученными [Hunziker, 2002]. У взрослых млекопитающих и человека суставной хрящ сохраняется в четы-

рых зонах: поверхностной, промежуточной, радиальной (базальной) и зоне кальцифицированного хряща [Nishiyama, et al., 1998; Pacifici, et al., 2000]. Хондроциты всех зон суставного хряща сохраняются и функционируют до тех пор, пока в результате травм, воспаления или других повреждений не потеряют способность регулировать свои свойства [Pacifici, et al., 2005].

Хондроцитам присущи две главные функции. Они составляют клеточный компонент хрящевой ткани и играют центральную роль в образовании кости в процессе эндохондриальной оссификации. На протяжении всей жизни происходит образование хондроцитов из МСК, прехондрогенных клеток и клеток предшественников хондроцитов, не обладающих специфическими маркерами для их выявления. Клетки-предшественники хондроцитов имеют вид обычных фибробластов и синтезируют, подобно фибробластам, коллаген I и III типов, фибронектин и протеогликаны нехрящевого типа. Региональные СК с хондрогенным потенциалом выявляются на протяжении всей взрослой жизни и индуцируются к дифференцировке в хондроциты во время образования каллуса при переломах или остеофитов, а также в случае формирования эктопического хряща.

Впервые образование хрящевой ткани клетками стромы КМ морской свинки было описано в 1976 году А. Я. Фриденштейном [243]. При помещении культивированных *in vitro* клеток КМ в диффузионные камеры и имплантации последних в брюшную полость животных автор выявлял затем в камерах наличие хряща, что подтверждалось гистологическими исследованиями. После этой публикации прошло более 20 лет, пока были разработаны эффективные методы индуцированной хондрогенной дифференцировки, которые стали применяться для клеток человека [594; 827; Mackay, et al., 1998; Meyer, Wiesmann, 2006].

Первичные хондроциты могут быть получены из эксплантатов суставного хряща. В культуральных условиях хондроциты теряют присущий им фенотип, экспрессию коллагена типа II, приобретают морфологические черты фибробластов и подвергаются активной пролиферации. У дедифференцированных хондроцитов рядом методов можно восстановить утраченный *in vitro* фенотип.

Для исследования дифференцировки МСК человека в хондрогенном направлении суспензию культивированных клеток помещают в полипропиленовую культуральную пробирку и подвергают осторожному центрифугированию. МСК не прикрепляются к полипропилену, но слипаются между собой, образуя однородную клеточную массу. Спустя 24 часа клетки подвергаются ресуспензированию и плавают в среде, не прикрепляясь. После культивирования в течение 2–3 недель в бессывороточной среде, содержащей TGF β 3, дексаметазон, аскорбат и инсулин, клетки экспрессируют экстраклеточный матрикс, богатый протеогликанами хряща и коллагеном типа II [594]. Более высокое выживание клеток и более активную хондрогенную реакцию наблюдали в культуральной среде с повышенным содержанием глюкозы (4,5 г/л) [Mackay, et al., 1998]. При достижении высокой плотности клеток, создающей условия трехпространственного роста, клетки могут подвергнуться гипертрофической дифференцировке, напоминающей процессы, происходящие *in vivo* при созревании хряща. Изучение гистологическим методом развития хрящевой ткани из МСК человека в осадке клеточной массы позволило установить, что дифференцировка начинается во многих местах одновременно и затем распространяется из мест первичного появления. В течение первой недели масса осадка изменяется мало, но на протяжении 2-х последующих недель она увеличивается в 2–3 раза. Клетки, располагающиеся ближе к поверхности, раньше приобретают положительную реакцию на коллаген типа II, тогда как клетки в центре еще продолжают дифференцировку. Количество МСК в осадке для хондрогенной дифференцировки должно быть ограничено 50000–300000 клеток, так как при более высоком числе клеток происходит фрагментация осадка [594]. Альтернативой этого метода является культивирование клеток на матриксе из различных материалов в монослойной культуре. Выделенные и размножившиеся МСК могут быть индуцированы дексаметазоном и трансформирующим фактором β 3 (TGF β 3) к секреции ЭКМ, включающего коллаген типа II, аггрекан и анионные протеогликаны, то есть к проявлению признаков хондрогенной дифференцировки. Показано [455], что после внутрибрюшинного введения МСК человека плоду овцы эти клетки принимают участие в образовании суставных хондроцитов хряща.

Дифференцировка хондроцитов в монослойной культуре выдвинула определенные требования для тканеинженерных конструкций, которые могут использоваться для экспансии клеток. В связи с тем, что хондроциты экспрессируют множество интегриновых рецепторов, проявляющих специфичность к различным адгезивным белкам, предположили, что хондроциты, выращенные на разных субстратах (пластик, фибронектин, коллаген типа I или II) будут иметь различный фенотип. Однако оказалось, что субстраты ЭКМ не вызывают значительных изменений морфологии хондроцитов, генной экспрессии, образования матрикса или организации цитоскелета. На всех этих субстратах хондроциты образовывали равнозначные матриксы, которые по-том регулировали поведение клеток [Brodkin, et al., 2004].

Украинские авторы в качестве носителя МСК использовали альгинатные микрокапсулы [Коструб и соавт., 2007]. Выбор носителя в данных случаях основан на том, что для конденсации клеток и выработки ими внеклеточного матрикса хондроциты должны находиться в специфическом пространственном микроокружении, которое характеризуется высокой плотностью окружающего вещества и гипоксическими условиями. После экспансии МСК КМ человека в монослойной культуре клетки заключали в альгинатные микроносители размером 0,5–0,8 мм и культивировали в среде, содержащей TGFβ3 (10 нг/мл), аскорбат и инсулин. На рис. 20.2А показан вид альгинатных микроносителей с заключенными в них МСК. Через 3 дня культивирования клетки начинали конденсировать и формировать агрегаты. В процессе культивирования было отмечено увеличение размеров агрегатов (рис. 20.2Б). Через 17 суток культивирования агрегаты экспрессировали коллаген типа II и окрашивались Alcian Blue, что свидетельствовало о присутствии в матриксе протеогликансульфатов. Через 1 сутки после индукции хондрогенной дифференцировки под артроскопическим контролем проводили аутологичную трансплантацию микрокапсул с МСК пациентам с повреждением хряща коленного сустава. У больных наблюдали позитивную реакцию на трансплантацию, которая выражалась в постепенном прекращении болевого синдрома и проявлений синовита, а также в увеличении амплитуды движения в суставе.

Gao и др. [262] выращивали хондроциты из МСК КМ в цилиндрических конструкциях. Спустя 3–6 недель после имплантации *in vivo* конструкций с клетками в подкожный карман сингенных крыс отмечали встраивание конструкций в окружающие хрящевую и костную ткани. В исследованиях [Alhadlaq, et al., 2004; Alhadlaq, Mao, 2003; Alhadlaq, Mao, 2004] была решена более сложная задача — индукция остеохондриальной дифференцировки двух слоев клеток, помещенных

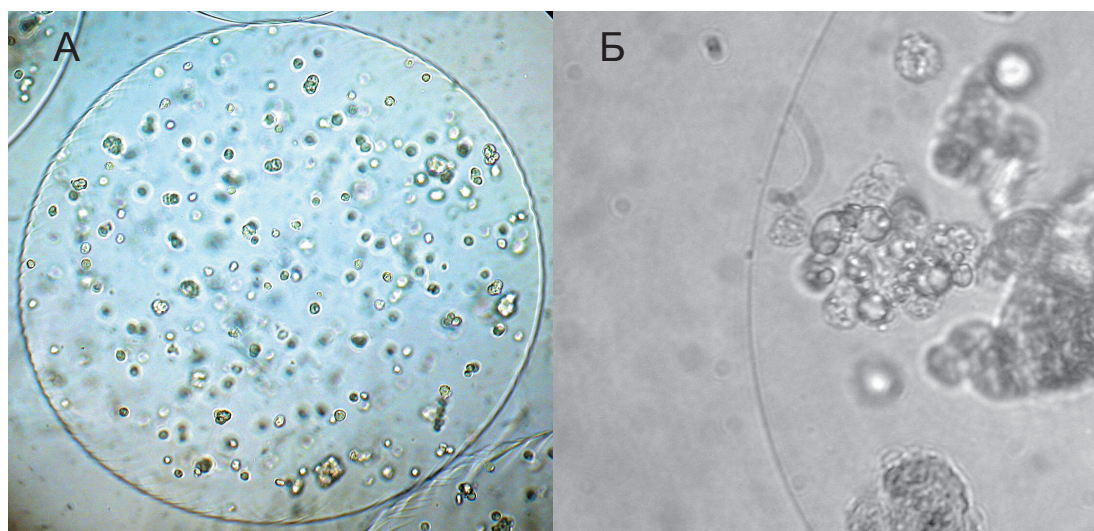


Рис. 20.2. Альгинатные микроносители с МСК КМ человека через 1 день (А) и 17 дней (Б) культивирования в среде, индуцирующей хондрогенез. Наблюдается конденсация клеток и образование ЭКМ (по данным Коструб и соавт., 2007)

на конструкцию, выполненную в форме мыщелка сустава человека (рис. 20.3). Остеохондриальные конструкции имплантировали под кожу спины иммунодефицитным мышам. Спустя 8 недель констатировали образование суставного мыщелка. При микроскопическом исследовании новообразованной ткани в ней выявляли остеогенный слой с характерным наличием минеральных узелков и хондрогенный слой, в котором минерализации не было. Спустя 12 недель после имплантации конструкции *in vivo* иммуногистохимическими методами в хрящевом слое новообразованного мыщелка были обнаружены маркеры хряща, такие как сафранин О, коллагены типов II и X. При последующей работе в этом направлении было установлено, что созревание и дегенерация хондроцитов, также как субхондриальный остеогенез, контролируются рядом ростовых факторов и гормонов: BMP, IGF, FGF, белков Hedgehog, в частности *Ihh*, рецепторами паратгормона и ретиноидами. Например, *Ihh* координируют пролиферацию хондроцитов, дифференцировку (конверсию) хондроцитов и остеобластов, срастание хондрогенеза с остеогенезом [Rahaman, Mao, 2005].

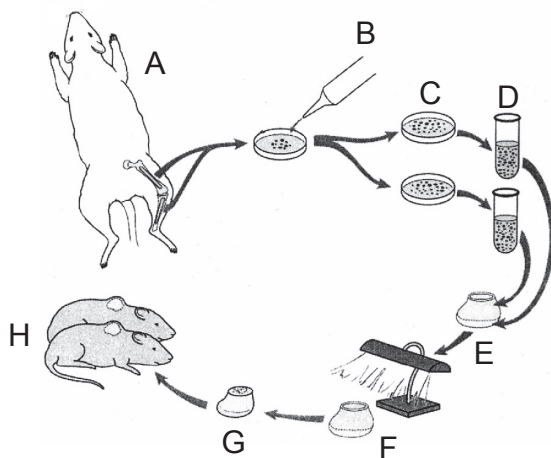


Рис. 20.3. Экспериментальный протокол тканевой инженерии мыщелка сустава

Для получения методом тканевой инженерии суставных мыщелков используют хрящевые и костные компоненты, полученные из одной популяции МСК. (А) — получение МСК из тибиадно-бедренного комплекса крысы; (В) — экспансия первичных МСК в культуре; (С) — обработка популяции разросшихся МСК хондрогенной средой, содержащей TGF- β 1, и остеогенной средой, содержащей дексаметазон, β -глицерофосфат и аскорбиновую кислоту; (D) — разделение полиэтиленгликолем хондрогенной и остеогенной суспензий, происходящих из МСК; (Е) — заливка гидрогелевой хондрогенной суспензией обратной формы суставного мыщелка (по толщине приблизительно 2 мм), сопровождающаяся фотополимеризацией ультрафиолетовым светом; (F) — заливка верхней части обратной формы суставного мыщелка той же гелевой суспензией остеогенных клеток, также сопровождаемая фотополимеризацией; (H) — помещение полученной остеохондриальной конструкции мыщелка в подкожный карман на спине иммунодефицитной мыши. По данным Alhadlaq, et al., 2004.

20.2. Некоторые особенности сухожилий и связок

Сухожилия и связки состоят из фиброзной соединительной или фибрознохрящевой ткани. Фибрознохрящевая ткань обнаруживается вблизи места прикрепления связки или сухожилия к кости и характеризуется плотно уложенными волокнами коллагена, сориентированными так, чтобы вынести максимальную нагрузку. Молекулы коллагена состоят из фибрилл, упакованных в волокна. Основная функция сухожилий и связок заключается в передаче механического усилия от скелетных мышц, обеспечивающих движение костей в суставах. Вода составляет более 60 % влажного веса связок и ~55 % влажного веса сухожилий. Примерно 20 % объема связок занимают фибробласты, а остальной объем образует ЭКМ, состоящий из макромолекул коллагенов, протеогликанов, эластина и гликопротеинов. Сухожилия, кроме воды, имеют в своем составе

коллагены (с преобладанием коллагена типа I ~85 % сухого веса) и протеогликаны (преимущественно декорин). По сравнению со связками сухожилия отличаются меньшей биологической активностью, меньшей клеточностью и меньшим количеством перекрестных связей между коллагеновыми волокнами [Rahaman, Mao, 2005].

Естественным материалом несущих конструкций для образования связок и сухожилий методами тканевой инженерии является коллаген. Клетки, культивированные в коллагеновых гелях, образуют ЭКМ и встраиваются по продольной оси тканевого эквивалента, обеспечивая посредством этого ровное размещение клеток в связках *in vivo*. Фибробласты, посеянные в коллагеновые гели и прикрепившиеся к коллагеновым волокнам, со временем изменяют свою форму, пролиферируют и мигрируют, что сопровождается синтезом белка и морфогенезом матрикса [Nishiyama, et al., 1998]. Кроме коллагена, для получения более прочных трехпространственных конструкций для заселения и культивирования клеток используют деградирующие в организме полимеры (сложные эфиры): полигликолиевую кислоту (PGA), полилактиковую кислоту (PLA) и их сополимер полилактидогликолиевую кислоту (PLGA), альгинаты. Биосовместимость этих материалов установлена многими исследователями, в частности, с такими высокоорганизованными тканями, как головной и спинной мозг [Lavik, et al., 1998].

Для тканевой инженерии передней крестообразной связки коленного сустава разрабатываются матриксы, получаемые на основе волокон шелка, обеспечивающие хорошие механические свойства новообразованных связок (отсутствие жесткости, сила растяжения и др.) и достаточную клеточную массу [Rahaman, Mao, 2005]. Тканевая инженерия связок и сухожилий предполагает применение ростовых факторов: непосредственное или путем переноса соответствующего гена вирусным вектором. Имеется много наблюдений, что в поврежденных связках и сухожилиях отмечаются повышенные уровни TGF- β 1, PDGF, bFGF и EGF. Многочисленные работы *in vivo* и *in vitro* показывают, что перечисленные ростовые факторы, а также IGF1, BMP-2 и BMP-12 способствуют пролиферации фибробластов и синтезу белков, улучшают структурные свойства тканей, стимулируют митогенную реакцию фибробластов и содействуют заживлению поврежденных связок и сухожилий.

Фиброкостные конструкции, полученные методом тканевой инженерии, имеют большое перспективное значение в лечении повреждений связок и сухожилий, особенно в тех случаях, когда последние составляют единое целое с костью. Вследствие недостатка тканеобразующих клеток в поврежденных сухожилиях и связках, фибробласты и фиброхондроциты необходимы для успешных результатов инженерии сухожилий и связок. В последнее время предпринимаются попытки включения двух или более клеточных линий в тканевую конструкцию для инженерии сложных образований, таких как синовиальный сустав, мышечно-сухожильный комплекс, соединение связка-кость.

Успехи в изучении СК должны способствовать целям тканевой инженерии. Дефекты костей, хрящей, сухожилий и связок больших размеров вряд ли могут быть излечены без привлечения большого числа тканеобразующих клеток. Поэтому на современном этапе стоит задача разработки тканеинженерных конструкций хрящей, сухожилий и связок с использованием МСК.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Коструб А. А., Грищенко В. И., Петренко А. Ю. и др. Использование стволовых клеток стромы костного мозга в лечении пациентов с повреждением суставного хряща коленного сустава // Вісник ортопедії, травматології та протезування. — 2007. — Т. 52, 1. — С. 34–38.

Павлова В. Н., Коньева Т. Н., Слуцкий Л. И., Павлов Г. Г. // Хрящ. — М., Медицина, 1988. — С. 225–265.

Alhadlaq A., Elisseeff J. H., Hong L., et al. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle // Ann. Biomed. Eng. — 2004. — Vol. 32, 7. — P. 911–923.

Alhadlaq A., Mao J. J. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells // J. Dent. Res. — 2003. — Vol. 82, 12. — P. 951–956.

Alhadlaq A., Mao J.J. Mesenchymal stem cells: Isolation and therapeutics // *Stem Cell Dev.* — 2004. Vol. 13. — P. 436–448.

Barna M., Niswander L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes // *Dev. Cell.* — 2007. — Vol. 12. — P. 931–941.

Brodikin K.R., Garcia A.J., Levenston M.E. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers // *Biomaterials.* — 2004. — Vol. 25. — P. 5929–5938.

Hunziker E.B. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes // *Microsc. Res. Tech.* — 1994. — Vol. 28. — P. 505–519.

Hunziker E.B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects // *Osteoarth. Cartil.* — 2002. — Vol. 10. — P. 432–463.

Lavik E., Teng Y.D., Snyder E., et al. Seeding neural stem cells on scaffolds of PGA, PLA and their copolymers // *Methods in Mol. Biol.* — 1998. — Vol. 198. — P. 89–96.

Mackay A.M., Beck S.C., Murphy J.M., et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow // *Tissue Eng.* — 1998. — Vol. 4. — P. 415–428.

Meyer U., Wiesmann H.P. // *Bone and Cartilage Engineering.* — Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. — 2006. — 250 p.

Nishiyama T., Tominaga N., Hayashi T. Quantitative evaluation of the factors affecting the process of fibroblast-mediated collagen contraction by separating the process into three stages // *Collagen Relat. Res.* — 1998. — Vol. 8. — P. 259–273.

Pacifici M., Koyama E., Iwamoto M., Gentili C. Development of articular cartilage: what we know about it and how may it occur? // *Connect. Tissue Res* — 2000. — Vol. 41. — P. 175–184.

Pacifici M., Koyama E., Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries // *Birth Defects Res. C Embryo Today.* — 2005. — Vol. 75. — P. 237–248.

Rahaman M.N., Mao J.J. Stem Cell-Based Composite Tissue Constructs for Regenerative Medicine // *Biotechnol .Bioengineer.* — 2005. — Vol. 91, 3. — P. 261–284.

Zuscik M.J., Hilton M.J., Zhang X., et al. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress // *J.Clin. Invest.* — 2008. — Vol. 118. — P. 429–438.

ГЛАВА 21. СВОЙСТВА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНЫХ И ПОСТОЯННЫХ ЗУБОВ

21.1. Стволовые клетки молочных зубов

Мультипотентные МСК могут быть выделены из зубной пульпы [Pierdomenico, et al., 2005]. В последние годы было показано, что пульпа зубов является источником аутологичных стволовых/прогениторных клеток, которые могут быть применены для таких терапевтических целей, как восстановление/регенерация краниофасциальных костей. Потребность в исследованиях данного направления достаточно высока. В странах одной только Европы каждый год подвергаются кранио-фасциальной реконструкции около 1500000 человек и примерно у 20 % этих больных отмечается потеря функции, несмотря на проведенную реконструкцию [D'Aquino, et al., 2009].

Механизмы, контролирующие рост и замену зубов в процессе развития, в значительной степени еще не известны [Parner, et al., 2002]. В частности, остается открытым вопрос, каким образом в этом участвуют черепнофасциальные структуры, окружающие зубы. Зубная пульпа происходит из уникального провизорного органа эмбриона — нервного гребня [Chai, et al., 2000]. Клетки головного отдела нервного гребня формируют костно-мышечный и хрящевой каркасы, соединительную ткань лицевого черепа и шеи, включая хрящи гортани, уха, внутреннего уха, строуму тимуса, нейроэпителий щитовидной железы, зачатки зубов [25]. Они также дают начало многим типам клеток, таким как нейральные, пигментные, гладкомышечные, шванновские клетки, чувствительные нейроны спинного мозга, клетки проводящей системы и клапанов сердца и другие, в том числе клетки зубной пульпы [LaBonne, Bronner-Fraser, 1999]. Установлено, что после повреждения спинного мозга клетки зубной пульпы могут образовывать нейротропные факторы и даже мотонейроны [Nosrat, et al., 2001].

Miura и др. из остатков расслаивающихся молочных зубов (резцов) выделили мультипотентные СК, способные к дифференцировке в одонтобласты, адипоциты и нейральные клетки [Miura, et al., 2003]. СК молочных зубов, происходящие, очевидно, из периваскулярного микроокружения, экспрессировали поверхностные маркеры STRO-1 и CD146 (MUC18) — маркеры МСК — и локализовались в остатках пульпы вокруг кровеносных сосудов. После трансплантации иммунодефицитным мышам размноженных *ex vivo* СК молочных зубов человека наблюдали появление у реципиентов одонтобластов человека и дентинподобного материала. Но СК молочных зубов, в отличие от СК из пульпы постоянных зубов, были неспособны регенерировать *in vivo* полный комплекс дентин-пульпы. Зато СК молочных зубов отличались более высокой скоростью пролиферации, повышенным числом делений в популяции (включение BrdU в течение 12 часов), образованием сфероподобных кластеров при росте в культуре и остеоиндуктивной способностью *in vivo*. Авторы предполагают, что СК молочных зубов не дифференцируются прямо в остеобласты, а принимают участие в формировании новой кости, образуя остеоиндуктивную матрицу. Молочные зубы не только осуществляют контроль за прорезыванием постоянных зубов, что обычно не оспаривается, но могут также во время прорезывания вовлекаться в индукцию костеобразования.

Приведенные данные позволяют рассчитывать на то, что внедрение СК молочных зубов в ткань поврежденного постоянного зуба позволит восстановить его целостность, не прибегая к использованию синтетических пломбировочных материалов. Эта гипотеза уже сейчас находится на стадии клинических испытаний. В ряде стран, в частности, в Японии, объявлено об открытии банка молочных зубов, которые будут использоваться для получения клеточных препаратов, пригодных к применению в медицинской практике.

21.2. Стволовые клетки постоянных зубов

Переход от молочных зубов к постоянным является уникальным и динамическим процессом, в котором развитие и прорезывание постоянного зуба координируется с поглощением корнями молочного зуба. Этот процесс может продолжаться у человека более 7 лет и приводит к полному, предопределенному замещению всех 20 молочных зубов [Parner, et al., 2002].

Плотные ткани зуба состоят из дентина и эмали, образуемых соответственно одонтобластами, происходящими из дорсального краниального (черепного) нервного гребня, и амелобластами, происходящими из эпителия [43]. Рано мигрируя из той части гребня, которая относится к среднему мозгу, одонтобласты заселяют дентальную мезенхиму челюстных коренных зубов первой жаберной дуги. Мезенхимальные клетки, не происходящие из краниального нервного гребня, также выявляются, причем в преобладающем числе, в регионах, в которых развиваются коренные зубы. Наиболее удивительная черта одонтобластов — их постмитотическая природа. После завершения митозов и начала дифференцировки клеток преодонтобласты располагаются по периферии дентальной пульпы перпендикулярно к основной мембране и примыкают к эпителию внутренней эмали. Окончательной дифференцировке в одонтобласты подвергаются только дочерние клетки, соседствующие с основной мембраной [Chai, et al., 2000].

Периваскулярная ниша дентальной пульпы укрывает ткань пульпы, происходящую в онтогенезе из мигрирующих клеток краниального нервного гребня. Эта ниша легкодоступна и содержит различные популяции мультипотентных стволовых/прогениторных клеток [Gronthos, et al., 2002; Miura, et al., 2003; Shi, Gronthos, 2003; Nosrat, et al., 2001]. Авторы работы [44] предположили, что во время эмбрионального развития клетки краниального нервного гребня дифференцируются во многие типы клеток, включая нейроны периферической нервной системы. Действительно, было показано, что СК дентальной пульпы взрослого человека, происходящие из третьих коренных зубов, дифференцируются в типы клеток, выявляемых в период эмбрионального развития краниального нервного гребня. Авторы предположили, что СК дентальной пульпы взрослого человека реагируют на сигналы окружающей среды и наиболее часто дифференцируются в функционально активные нейроны. СК дентальной пульпы, размноженные *ex vivo*, реагировали на нейрональные индуктивные сигналы как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом СК дентальной пульпы, но не фибробласты человека, приобретали нейрональную морфологию и экспрессировали нейрональные специфические маркеры, как белковые, так и генетические. При экспозиции с нейрональной индуктивной средой СК дентальной пульпы проявляли способность к образованию натриевого сигнала, совместимого с функционирующими нейрональными клетками. После трансплантации в мезенцефалон куриного двухдневного эмбриона СК дентальной пульпы также экспрессировали нейрональные маркеры и приобретали нейрональную морфологию. Авторы [44] заключили, что дентальная пульпа представляет собой доступный источник СК для клеточной терапии неврологических заболеваний.

Одонтобласты продуцируют основную часть компонентов ЭКМ, обнаруживаемых в дентине, и участвуют в минерализации дентина [271]. Главные особенности ЭКМ зубной пульпы позволяют понять, почему пульпа является в норме неминерализованной тканью. *In vitro* или *in vivo* некоторые молекулы ЭКМ дентина действуют как нуклеаторы кристаллов и способствуют росту последних, тогда как другие молекулы являются ингибиторами минерализации. При лечении умеренно развивающегося кариеса одонтобласты и клетки субодонтобластического слоя вовлекаются в образование реакционного дентина. Лечение более глубоких поражений путем контакта с пульпой приводит к образованию клетками пульпы репаративного дентина. Реакция на прямое пломбирование такими материалами как гидроокись кальция вызывает образование мостика дентина, происходящего из рекрутированных и пролиферирующих недифференцированных клеток, которыми могут быть либо СК, либо дедифференцированные и трансдифференцированные зрелые клетки. Дифференцированные клетки синтезируют матрикс, подвергающийся минерализации. На животных моделях исследовали способность биоактивных молекул содействовать восстановлению пульпы после имплантации их в пульпу. Молекулы ЭКМ индуцировали образование мостиков дентина или больших зон минерализации в коронарной (венечной) пульпе. Они могли также стимулировать закрытие пульпы в канале корня. Таким образом, некоторые молекулы, обнаруженные в ЭКМ дентина, могут найти применение при лечении зубов в качестве биоактивных агентов для восстановления пульпы или в тканевой инженерии.

Главным неорганическим компонентом дентина является гидроксиапатит, тогда как органический компонент состоит, главным образом, из коллагена типа I и небольших количеств неколлагеновых белков, обнаруживаемых в экстраклеточном матриксе: декорина, бигликана, остеонектина, остеокальцина, сиалопротеина и фосфопротеина. Два последних белка являются специфическими для матрикса дентина. Кроме матричных белков в составе дентина часто обнаруживаются сигнальные молекулы, такие как TGF, BMP, FGF [Nosrat, et al., 2001; Laino, et al., 2005].

Одонтобласты — дифференцированные клетки, секретирующие органический матрикс дентина на протяжении всей жизни млекопитающего. Кариезные и травматические повреждения зубов часто оказываются летальными для одонтобластов, которые заменяются тогда другими клетками пульпы. Эти клетки возникают в результате экспансии и дифференцировки СК пульпы и составляют одонтобласты второго поколения или новые одонтобласты. Многообразие терминов отражает недостаточную исследованность этих клеток, тем не менее установлено, что они способны продуцировать репаративный дентин [Gronthos, et al., 2000]. Дальнейшие исследования показали их способность к самообновлению и дифференцировке в клетки кости и хряща. Так, About и др. [About, et al., 2000] провели эксперименты, моделирующие регенерацию дентина *in vitro*, используя пульпу третьих коренных зубов человека. При культивировании в присутствии β -глицерофосфата клетки пульпы образовывали узелки минерализации. Одонтобласты, способствующие образованию узелков, экспрессировали коллаген типа I, остеонектин и нестин. Как органический, так и минеральный состав узелков имел все характерные свойства дентина человека и отличался от свойств эмали и кости. Было установлено, что в патологических условиях секреторная активность одонтобластов стимулируется к выработке дентина, но образование глубокой полости приводит к разрушению одонтобластов. Авторы предположили, что стимуляция образования дентина может быть обусловлена сигнальными молекулами TGF- β 1 и BMP-2, освобождаемыми из дентина во время деминерализации.

Характеристика сигнальных процессов, ответственных за индукцию дифференцировки одонтобластов, является основой для понимания как физиологического дентиногенеза, так и восстановления ткани. Основное значение имеют трансформирующие ростовые факторы семейства бета, которые могут быть прямо вовлечены в сигнальную дифференцировку одонтобластов и одонтобластоподобных клеток [271]. Экспрессия ростовых факторов внутреннего эпителиального слоя эмали приводит к их секвестрации внутри дентального ЭКМ для представления преодонтобластам. Главное значение в сигнализации дифференцировки одонтобластов *in vitro* имеют TGF- β , BMP-2 и IGF-1. Экспрессия ростовых факторов одонтобластами после дифференцировки может привести к их секвестрации внутри дентинового матрикса, в который они могут попадать после повреждения зуба. Такой пул ростовых факторов может сигнализировать о репаративных процессах, приводящих к дифференцировке одонтобластоподобных клеток. Другие факторы роста также могут экспрессироваться одонтобластами, но они не секвестрируются внутри дентинового матрикса. TGF β 1, но не TGF- β 3, имеет высокое сродство к протеогликанам декорина и биогликанам внутри дентинового матрикса, таким образом усиливая секвестрацию в этом матриксе. В васкулатуре комплекса дентин-пульпа могут быть важны несколько ростовых факторов, секретируемых, вероятно, одонтобластами.

СК дентальной пульпы способны *in vitro* дифференцироваться в остеобласты, секретируют обильный ЭКМ и регенерировать изношенную кость [Laino, et al., 2005]. Показано, что после трансплантации иммунодефицитным крысам СК дентальной пульпы способны образовать конечную дифференцированную и хорошо васкуляризованную пластинчатую кость [Laino, et al., 2006; Graziano, et al., 2008]. Было показано также, что после нейтральной индукции *in vitro* СК дентальной пульпы конститутивно экспрессируют незрелые маркеры, в частности, нестин, который связан с нейрональными предшественниками. Это подтверждает первичные наблюдения, что размноженные *ex vivo* клетки, происходящие из дентальной пульпы, конститутивно экспрессируют нестин и GFAP [Gronthos, et al., 2002].

Японские исследователи из Национального института промышленной науки и технологии сообщили о выделении СК из удаленных зубов мудрости. Эти СК, также как МСК, способны дифференцироваться в различные ткани организма, включая костную, хрящевую и жировую. Причем для перепрограммирования клеток из пульпы зубов мудрости во взрослые СК необходимо всего 3 гена: Oct4, Sox2 и Klf4. При этом выход мультипотентных клеток был таким же, как в группе Yamanaka [816]: 10 СК на каждые 50000 клеток в первичных колониях*. В исследовании [Yan, et al. 2010] с использованием четырех генов (Lin28/Nanog/Oct4/Sox2 или c-Мyc/Klf4/Oct4/Sox2) были успешно перепрограммированы три различных типа стволовых/прогениторных клеток зубов мудрости. При этом скорость перепрограммирования СК из всех источников была выше, чем фибробластов. Другие авторы [Suchanek, et al., 2009] исследовали 16 линий СК пульпы зубов, полученных из третьих коренных зубов. На 9-м пассаже жизнеспособность клеток была около 90 %. Фенотипический анализ выявил экспрессию CD29, CD44, CD90, HLA I и отсутствие экспрессии CD34, CD45, CD71 и HLA II. Линии СК, полученных из пульпы зубов, не проявляли признаков дегенерации или спонтанной дифференцировки в течение всего процесса экспансии. Авторы [d'Aquino et al., 2009] для лечения дефекта кости нижней челюсти применили биокomплекс, полученный из стволовых/прогениторных клеток пульпы зуба и коллагеновой губки. СК были выделены из третьих коренных зубов и засеивались на коллагеновую губчатую платформу. Образующийся биокomплекс применяли для заполнения поврежденного места, образующегося после экстракции третьих коренных зубов нижней челюсти. Через 3 месяца после аутологичной трансплантации наблюдали оптимальное вертикальное восстановление альвеолярной кости и регенерацию периодонтальной ткани до вторых коренных зубов. Гистологическое исследование подтвердило полную регенерацию кости в месте повреждения. Спустя год оптимальная регенерация была вновь подтверждена.

На основании представленных работ можно заключить, что зубная пульпа взрослого человека представляет легкодоступный источник стволовых/прогениторных клеток, который может найти применение в клинике.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

About I., Laurent-Maquin D., Lendahl U., et al. Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions // Am. J. Pathol. — 2000. — Vol. 157. — P. 287–295.

Chai Y., Jiang X., Ito Y., et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis // Development. — 2000. — Vol. 127. — P. 1671–1679.

D'Aquino R., Graziano A., Sampaolesi M., et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation // Cell Death. Differ. — 2007. — Vol. 14. — P. 1162–1171.

D'Aquino R., De Rosa A., Lanza V., et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponges biocomplexes // Eur. Cells & Materials. — 2009. — Vol. 18. — P. 75–83.

Graziano A., d'Aquino R., Laino G., et al. Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo // Cell Prolif. 2008. — Vol. 41. — P. 1–11.

Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., et al. Postnatal human dental pulp stem cells in vitro and in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 13625–13630.

Gronthos S., Brahimi J., Li W., et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells // L. Dent. Res. — 2002. — Vol. 81. — P. 531–535.

La Bonne C., Bronner-Fraser M. Molecular mechanisms of neural crest formation // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. — 1999. — Vol. 15. — P. 81–112.

Laino G., D'Aquino R., Graziano A., et al. A new source of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue // J. Bone Miner. Res. — 2005. — Vol. 20. — P. 1394–1402.

* Информация представлена на сайте http://www.gazeta.ru/news/science/2009/04/24/n_1355364.shtml

Laino G., Carinci F., Graziano A., et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp // *J. Craniofac Surg.* — 2006. — Vol. 17. — P. 511–515.

Laino G., Graziano A., D'Aquino R., et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering // *J. Cell Physiol.* — 2006. — Vol. 206. — P. 693–701.

Miura M., Gronthos S., Zhao M., et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 5807–5812.

Nosrat I.V., Widenfalk J., Olson L., et al. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro and rescue motoneurons after spinal cord injury // *Dev. Biol.* — 2001. — Vol. 238. — P. 120–132.

Parner E.T., Heidmann J.M., Kjaer I., et al. Biological interpretation of the correlation of emergence times of permanent teeth // *J. Dent. Res.* — 2002. — Vol. 81. — P. 451–454.

Pierdomenico L., Bonsi L., Calvitti M., et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp // *Transplantation.* — 2005. — Vol. 80. — P. 836–842.

Shi S., Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp // *J. Bone Miner. Res.* — 2003. — Vol. 18. — P. 696–704.

Suchanek J., Soukup T., Visek B., et al. Dental pulp stem cells and their characterization // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* — 2009. — Vol. 153, 1. — P. 31–36.

Yan X., Qin H., Qu C., et al. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. // *Stem Cells Dev.* — 2010. — Vol. 19, 4. — P. 469–480.

ГЛАВА 22. РОЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РАЗВИТИИ И РЕМОДЕЛИРОВАНИИ ПОЧЕК ПРИ ПАТОЛОГИИ

22.1. Участие стволовых клеток в развитии почек

На основании того, что клетки канальцев после острого повреждения почек проявляют способность к регенерации, предполагается наличие в этих органах, как и во многих других, региональной резервной популяции СК, способных к пролиферации и дифференцировке. У эмбриона потенциальным источником почечных СК может быть метанефрическая мезенхима, из которой образуются эпителиальные клетки нефрона, за исключением эпителия прямых мочевых протоков, происходящего из зачатка мочеточника, а также миофибробластов и гладких мышечных клеток. Другим источником СК у эмбриона может быть мезонефрос [102]. В связи с тем, что для развития этих двух эмбриональных тканей необходим один и тот же ген *Pax-2* [Herzlinger, et al., 1992], они кажутся тесно связанными. Тщательное исследование показало, что мезонефрос действительно богат СК. Этот участок является частью региона аорта — гонады — мезонефрос (АГМ), который теперь признается первым местом кроветворения в пренатальной жизни [496]. Таким образом, мезонефрос, имеющий тесную регуляторную и генетическую связь с метанефросом, содержит СК для развивающихся кроветворных и гонадных структур. Такие представления обосновывают теоретическую вероятность наличия СК в почках взрослого человека. Мозговое вещество почек является филогенетически более древним образованием, чем кора, и поэтому считается более вероятным местом локализации ниш СК [Thadhani, et al., 1996].

Маркеры почечных стволовых/прогениторных клеток пока неизвестны. Некоторые авторы [Maeshima, et al., 2003] обнаружили у крыс клетки, участвующие в регенерации почки, которые имели сходство с предшественниками СК. Для идентификации таких клеток был применен метод, уже проверенный на коже, роговице, кишечнике, легких и простате. Крысам в течение 7 дней вводили бромдезоксисуридин (BrdU), после чего определяли клетки, сохраняющие метку, у животных, выздоровевших от повреждения, связанного с почечной ишемией, и у контрольных крыс. По распространенному мнению, клетки, отличающиеся медленным клеточным циклом и в связи с этим длительно сохраняющие метку, можно отнести к прогениторным клеткам. На всех стадиях регенерации почки после повреждения в ее клетках, сохраняющих BrdU, обнаруживали экспрессию виментина — маркера мезенхимальных клеток и Е-кадгерина — маркера эпителиальных клеток. Авторы предположили, что именно эта популяция медленно циклирующих клеток участвует в регенерации канальцев почки. Частота клеток, сохраняющих метку, была слишком высокая (40 %) для того, чтобы признать их всех СК [Yokoo, et al., 2003]. Но именно такие клетки появлялись в почках после ишемического повреждения и проявляли клональный рост *in vitro*. Следует отметить, что клетки боковой популяции (SP) также выделялись из почки крысы, но они не содействовали регенерации этого органа после введения крысам реципиентам [Iwatani, et al., 2004]. Еще одним коллективом авторов [Bussolati, et al., 2005] предполагаемые СК были выделены из коркового интерстициума почки человека. Эти клетки были способны *in vitro* к экспансии и дифференцировке в эпителий и эндотелий, а после введения мышам SCID они образовывали канальцевые структуры и эндотелий в поврежденных почках. У этих клеток, наряду с мезенхимальными маркерами CD72, CD29 и CD44, была выявлена экспрессия маркеров *Pax-2* и CD133.

22.2. Ремоделирование почки при почечной недостаточности

Острая почечная недостаточность наиболее часто развивается в результате ишемического или токсического поражения почек и потенциально является обратимым состоянием. Основную роль в процессе развития недостаточности почек после ишемического или токсического воздействия имеют дисфункция и потеря эпителиальных клеток канальцев [Thadhani, et al., 1996]. Установлено, что эпителиальные клетки канальцев обладают примечательной способностью к регенерации. При экспериментальной острой почечной недостаточности для стимуляции регенерации канальцев последовательно применяются такие ростовые факторы как инсулино-

подобный фактор роста 1 (IGF-1), фактор роста гепатоцитов (HGF) и эпидермальный фактор роста (EGF) [Hammerman, Miller, 1994]. Интенсивная восстановительная активность эпителия канальцев отражает присущую этим клеткам способность быстрой адаптации к потере соседних клеток путем дедифференцировки и пролиферации. Важную роль в регуляции миграции, пролиферации и дифференцировки почечных эпителиальных клеток имеют, по-видимому, молекулы адгезии [Bonventre, 2003]. Предполагается, что процесс рубцевания в гломерулярных и тубуло-интерстициальных тканях почки начинается с взаимодействия инфильтрирующих воспалительных клеток и почечных клеток, что приводит к разрушению поврежденных клеток и замещению их экстраклеточным коллагеновым матриксом [226]. Далее как реакция на повреждение развивается регрессия эпителиальных клеток клубочков и канальцев к примитивному, эмбриональному мезенхимальному фенотипу. Поврежденные эндотелиальные клетки также временно утрачивают свой зрелый противокоагулянтный, противовоспалительный и антипролиферативный фенотип и приобретают новые прокоагулянтные, провоспалительные и митогенные характеристики [Savage, 1994]. Мезангиальные клетки в ответ на повреждение подвергаются де-/трансдифференцировке в эмбриональный фенотип, как бы повторяя эмбриогенез взрослых и зрелых клеток, способствующих заживлению и восстановлению мезангиальной целостности [225, 226]. Появление во время периода гломерулярного ремоделирования клеток клубочков с эмбриональными и мезенхимальными характеристиками позволяет говорить о пластичности гломерулярных клеток и обсуждать возможные механизмы происхождения некоторых этих клеток. Защитные способности организма могут быть связаны со стимулирующим действием на регенеративный потенциал сохранившихся клеток и с замещением поврежденных клеток новыми. Источником новых клеток могут быть тканевые мультипотентные СК, способные к образованию тканеспецифических дифференцированных клеток [Bonventre, 2003].

Также как клетки клубочков, эпителиальные клетки канальцев почки обладают способностью регрессировать из взрослого, зрелого фенотипа в эмбрионально-мезенхимальный фенотип в ответ на повреждающий стимул. Такая эпителиально-мезенхимальная трансформация происходит *in vitro* под влиянием таких ростовых факторов, как TGF- β 1, EGF и IL-1. Проксимальные эпителиальные клетки канальцев также теряют свой взрослый фенотип и некоторые маркеры (цитокератины) и приобретают миофибробластический фенотип с экспрессией α -актина гладких мышц (α -SMA) и виментина [Zeisberg, et al., 2000]. Дедифференцировка канальцевых клеток и последующая их пролиферация считаются ключевыми событиями в восстановлении тубулярного эпителия после повреждения [Abbattista, Schena, 2004].

В последние годы было установлено, что клетки КМ взрослых могут содействовать ремоделированию почки. По некоторым данным [Oliver, et al., 2004a; Oliver, et al., 2004b], клетки костномозгового происхождения активно проникают в почки и могут дифференцироваться в мезангиальные и тубулярные эпителиальные клетки, причем эти процессы возрастают после повреждения почки [Imai, Ito, 2002]. Эти клетки могут включаться в нормальный оборот мезангиальных клеток [Imasawa, et al., 2001], мигрировать в поврежденные клубочки, вовлекаться в реакцию мезангиума на повреждение [Ito, et al., 2001].

Крысы-химеры, содержащие клетки КМ с экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP), реагировали на мезангиолиз, вызванный введением антител к Thy1, репопуляцией мезангиума клетками с повышенным уровнем GFP [Ito, et al., 2001]. Для миграции этих клеток в поврежденные клубочки было необходимо введение PDGF, а также bFGF [Hasely, et al., 1999]. Роль bFGF связана с пролиферацией репопулирующих мезангиальных клеток. Предполагают, что при гломерулярном склерозе взаимодействие между резидентными клетками (эпителием канальцев и фибробластами) и инфильтрирующими воспалительными клетками приводит к инициации и прогрессированию тубулоинтерстициального рубцевания. Установлено, что эти взаимодействия регулируются многими стимулами, в том числе протеинурией, и опосредуются, вероятно, освобождением резидентными и воспалительными клетками хемокинов, цитокинов и ростовых факторов [Gupta, et al., 2002].

Последние экспериментальные и клинические данные предполагают содействие клеток КМ клеточной перестройке в почках. Также как ремоделирование клубочков, повреждение эпителия канальцев сопровождается поступлением в почки клеток КМ. На экспериментальных моделях и у человека были выявлены клетки костномозгового происхождения внутри регенерирующих канальцев [Gupta, et al., 2002; Poulson, et al., 2001]. После трансплантации КМ мышей самцов реципиентным самкам методом гибридизации *in situ* у 7,9 % эпителиальных клеток канальцев выявили наличие Y-хромосомы. Эти данные подтвердили включение клеток КМ в нормальный оборот клеток канальцев [Poulson, et al., 2001]. Те же авторы обнаружили подобное приживление клеток КМ в аллотрансплантате почки женщины у мужчины-реципиента.

Некоторые авторы [Morigi, et al., 2006] исследовали вопрос, какие именно СК, происходящие из КМ, способны улучшать почечную функцию и уменьшать повреждение канальцев при острой почечной недостаточности, индуцированной у мышей инъекцией цисплатина. Авторы обнаружили, что МСК, но не ГСК, способствуют восстановлению структуры почечных канальцев и улучшают почечную функцию. Защитное свойство МСК может быть обусловлено способностью этих клеток заселять поврежденный орган и интегрироваться в структуру почечных канальцев. Кроме того, позитивное действие МСК может быть связано с их способностью продуцировать многие ростовые и трофические факторы [807]. Показано, что в МСК *in vitro* образуются HGF и BMP, повышающие митогенную, противоапоптозную и морфогеническую активность эпителиальных клеток канальцев почки. Вместе с тем, в другой работе [Kale, et al., 2003] была показана возможность дифференцировки кроветворных клеток КМ в эпителиальные клетки почки. Через 16 недель после трансплантации клетки КМ трансгенных мышей превращались в клетки проксимальных канальцев почки мышей-реципиентов с ишемическим повреждением почек. Причем дифференцировка клеток КМ в почечную ткань отмечалась только после применения в качестве донорских клеток кроветворных клеток-предшественников с фенотипом Lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺ и не наблюдалась после введения реципиентам более зрелых Lin-позитивных клеток. Вместе с тем, Krause и др. [402], отметив дифференцировку вводимых СК КМ в эпителиальные клетки всего ЖКТ и многих других органов, не смогли выявить дифференцировку их в эпителиальные клетки канальцев почек. Возможно, это объясняется тем, что в данной работе мышам вводили не цельный КМ, содержащий МСК, а популяцию, полученную из разрастания единичной ГСК КМ. Исследуя биоптаты трансплантированных почек на этапе хронического отторжения [Grimm, et al., 2001] обнаружили внутри трансплантатов мезенхимальные клетки (фибробласты и миофибробласты) реципиента. Авторы заключили, что эти данные подтверждают наличие циркулирующей популяции клеток, способной мигрировать в зону почечного воспаления. Приведенные результаты свидетельствуют о перспективе использования МСК для ремоделирования почки.

22.3. Возможность терапевтического применения стволовых клеток при заболеваниях почек

В настоящее время появляется много работ, в которых обсуждается возможность применения клеточной терапии при заболеваниях почек. Клеточная терапия может быть успешной стратегией, обеспечивающей динамический и индивидуализированный терапевтический подход. СК могут обеспечить новейшие методы доставки лекарств, проведение иммунотерапии, тканевой регенеративной или заместительной инженерии [Abbattista, Schena, 2004]. Источниками СК для почечной терапии могут быть КМ взрослых и фетальные ткани, включая метанефрическую мезенхиму и мезонефроз. Системно вводимые СК могут разрастаться в местах почечного заболевания или повреждения и дифференцироваться в клетки, подобные гломерулярным, мезангиальным и тубулярным клеткам [Mollura, et al., 2003].

При хронической недостаточности почек могут быть использованы две различные терапевтические стратегии, зависящие от того, будут ли клетки КМ дифференцироваться и коммитироваться в мезенхимальные или кроветворные клетки. В случае заболевания, при котором необ-

ходимо создание резидентных клеток почек, таких как, например, врожденная недостаточность ферментов, должны трансплантироваться МСК. И, напротив, ГСК должны использоваться для доставки генов при таких заболеваниях, как, например, гломерулонефриты, при которых отмечается недостаток собственных цитокинов и ростовых факторов [Yokoo, et al., 2003]. Некоторые авторы [Humes, Szczypka, 2004] фиксируют внимание на применении стволовых/прогениторных клеток человека для лечения острой и хронической недостаточности почек как добавочного средства для успешного обновления процессов гемодиализа и гемофильтрации.

Таким образом, СК могут иметь терапевтическое значение при почечных заболеваниях благодаря той роли, которую они играют в процессе ремоделирования почек. СК могут усиливать регенеративные реакции клубочков и канальцев на повреждение. Предварительная обработка СК *in vitro* может повышать их терапевтический потенциал. Одним из важных направлений исследований является введение СК с целью замещения поврежденных нефронов. Доказательства разрастания и дифференцировки СК при острой почечной недостаточности и на конечной стадии почечной болезни повышают возможность использования клеточной терапии для обеспечения оптимального регенеративного процесса при заболеваниях почек.

СК также могут использоваться для развития методов генной терапии, имеющих целью лечение наследственных заболеваний почек. В стадии разработки находится гипотеза, что костномозговые СК могут быть генетически модифицированы, подвергнуты дифференцировке и введены в ткани реципиента для коррекции дефекта генома [Vollwiler et al., 2003]. Трансплантированные клетки легче контролировать, чем прямо введенные в организм гены или генные векторы, дальнейшую судьбу которых часто невозможно проследить.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Abbattista M.R., Schena F.P. Stem cells and kidney diseases // *Minerva Med.* — 2004. — Vol. 95, 5. — P. 411–418.

Bonventre J.V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2003. — Vol. 14. — P. 855–861.

Bussolati B., Bruno S., Grange C., et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney // *Am. J. Pathol.* — 2005. — Vol. 166. — P. 545–555.

Grimm P.C., Nickerson P., Jeffery J., et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection // *New Engl. J. Med.* // 2001. — Vol. 345. — P. 93–97.

Gupta S., Verfaillie C., Chmielewski D., et al. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure // *Kidney Int.* — 2002. — Vol. 62. — P. 1285–1290.

Hammerman M.R., Miller S.B. Therapeutic use of growth factors in renal failure // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 1994. — Vol. 5. — P. 1–11.

Hasely L.A., Hugo C., Reidy M.A. Dissociation of mesangial cell migration and proliferation in experimental glomerulonephritis // *Kidney Int.* — 1999. — Vol. 56. — P. 964–972.

Herzlinger D., Koseki C., Mikawa T., al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction // *Development* — 1992. — Vol. 114. — P. 565–572.

Humes H.D., Szczypka M.S. Advances in cell therapy for renal failure // *Transpl Immunol.* — 2004. — Vol. 12, N3-4. — P. 219–227.

Imai E., Ito T. Can bone marrow differentiate into renal cells? // *Pediatr. Nephrol.* — 2002. — Vol. 17. — P. 790–794.

Imasawa T., Utsunomiya Y., Kawamura T., et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2001. — Vol. 12. — P. 1401–1409.

Ito T., Suzuki A., Imai E., et al. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2001. — Vol. 12. — P. 2625–2635.

Iwatani H., Ito T., Imai E., et al. Hematopoietic and nonhematopoietic potentials of Hoechst(low)/side population cells isolated from adult rat kidney // *Kidney Int.* — 2004. — Vol. 65. — P. 1604–1614.

Kale S.K.A., Clark P.R., Kashgarian M., et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 112. — P.42–49.

Maeshima A., Yamashita S., Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2003. — Vol. 14. — P. 3138–3146.

Mollura D.J., Hare J.M., Rabb H. Stem-cell therapy for renal diseases // *Am. J. Kidney Dis.* — 2003. — Vol. 42, 5. — P. 891–905.

Morigi M., Benigni A., Remuzzi G., Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure // *Cell Transplant.* — 2006. — Vol. 15, Suppl 1. — P. 111–117.

Oliver J.A. Adult renal stem cells and renal repair // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* — 2004. — Vol. 13, 1. — P. 17–22.

Oliver J.A., Maarouf O., Cheema F.H., et al. The renal papilla is a niche for adult kidney stem Cells // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 795–804.

Poulsom R., Forbes S.J., Hodivala-Dilke K., et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration // *J. Pathol.* — 2001. — Vol. 195. — P. 229–235.

Savage C.O.S. The biology of the glomerulus: endothelial cells. // *Kidney Int.* — 1994. — Vol. 45. — P. 314–319.

Thadhani R., Pascual M., Bonventre I.V. Acute renal failure // *New Engl. J. Med.* — 1996. — Vol. 334. — P. 1448–1460.

Vollweiler J.L., Zielske S.P., Reese J.S., et al. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress toward therapeutic targets // *Bone Marrow Transplant.* — 2003. — Vol. 32. — P. 1–7.

Yokoo T., Sakurai K., Ohashi T., Kawamura T. Stem cell gene therapy for chronic renal failure // *Curr. Gene Ther.* — 2003. — Vol. 3, 5. — P. 387–394.

Zeisberg M., Strutz F., Muller G.A. Renal fibrosis: an update // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* — 2000. — Vol. 10. — P. 315–321.

ГЛАВА 23. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В РАЗВИТИИ, РЕГЕНЕРАЦИИ И ТЕРАПИИ ПЕЧЕНИ

23.1. Участие стволовых клеток в развитии печени

Гистогенез печени у млекопитающих и человека осуществляется сходным образом. У мышиных зародышей формирование печеночного дивертикула из энтодермы передней кишки происходит на 7,5–8,5 день эмбриональной жизни (Е 7,5–8,5) под влиянием сигнала из кардиальной мезодермы. Энтодермальные клетки в печеночной закладке пролиферируют и вторгаются в богатую коллагеном рыхлую соединительную ткань поперечной перегородки. У зародышей крыс начало печеночного морфогенеза происходит на 11-е сутки эмбриогенеза, а гепатобласты выявляются с 12-х суток. У человека печеночная почка возникает в конце 3-й недели эмбриогенеза, когда зародыш достигает длины 3 мм. Гепатобласты у человека обнаруживаются с 4-й недели беременности [838].

Печеночная паренхима на начальной стадии органогенеза состоит главным образом из гепатобластов, тогда как постнатальная и взрослая печеночная паренхима состоит в основном из эпителиальных клеток двух типов — зрелых гепатоцитов и клеток желчных протоков — холангиоцитов. Гепатобласты определяются как бипотентные клетки, которые служат предшественниками как гепатоцитов, так и холангиоцитов — клеток, формирующих систему желчных протоков печени [175, 686].

Свойства гепатобластов достаточно хорошо изучены в культуре и при экспериментальной трансплантации, так как их можно изолировать из фетальной печени в конце второй недели развития крыс и мышей. Так, в лаборатории Faris [231] из печени 13-дневного плода крысы выделили популяцию гепатобластов, содержащую клетки, которые после трансплантации в печень новорожденных крыс дифференцировались в гепатоциты и клетки желчных протоков. Гепатобласты, в отличие от гепатоцитов, не экспрессируют или экспрессируют в слабой степени мембранные антигены, представленные в окончательно дифференцированных гепатоцитах. Зато они экспрессируют α -ФП, инсулиноподобный фактор роста-2 (IGF), IGF-связывающие белки и несколько рибосомальных белков, не выявляемых в гепатоцитах. В процессе созревания гепатоцитов у них проявляется экспрессия протеаз (например, катепсина L), белков острой фазы (например, орозомукоида), ферментов, вовлекаемых в обмен метаболитов (например, никотинамид—метилтрансферазы), глюкозидов (например, Г6Ф) и аминокислот (например, ТАТ), характеризующих различные функции обмена печени. Наконец, многие белки, такие как альбумин, цитокератин 8 (ЦК 8) и цитокератин 18 (ЦК 18), выявляемые в гепатобластах, экспрессируются также гепатоцитами. Обычно гепатобласты характеризуются экспрессией таких маркеров, как альбумин, α -ФП, ЦК 17, ЦК 19, HNF-1 и HNF-4 [Kubota, Reid, 2000, Никитин, 2004].

Ранее считалось, что гепатобласты обладают исключительно бипотенциальными свойствами, так как при разных условиях культивирования они способны дифференцироваться в гепатоциты или клетки желчных протоков, которые легко узнать по ультраструктуре и характерным маркерам. Вместе с тем, в работе [175] было установлено, что достаточно рано, уже на 14 день беременности, в печени крыс присутствуют как бипотентные, так и унипотентные клетки. Используя метод двойного мечения клеток по маркерам альбумина, α -фетопротейна и ЦК-19 в фетальной печени крыс, авторы идентифицировали 3 популяции эпителиальных клеток:

- 1 — клетки, экспрессирующие альбумин и α -фетопротейн (предшественники гепатоцитов);
- 2 — клетки, экспрессирующие ЦК— 19 (предшественники эпителия желчных протоков);
- 3 — клетки, экспрессирующие все три молекулы (предшественники гепатоцитов и клеток желчных протоков).

Такая ситуация, очевидно, отражает степень дифференцировки гепатобластов на конкретном этапе развития печени. Следовательно, соотношение этих популяций эпителиальных клеток должно изменяться в ходе развития печени. Действительно, в лаборатории Dabeva [Sandhu, et al., 2001] взрослым крысам трансплантировали эпителиальные клетки, изолированные из пло-

дов разного срока гестации. В этих экспериментах было показано, что клетки, полученные из 12–14-дневных плодов, приживлялись и были способны образовывать как гепатоциты, так и холангиоциты. Вместе с тем, эпителиальные клетки 18-дневных плодов превращались только в гепатоциты, что свидетельствует о потере бипотентных свойств.

В развивающейся печени гепатобласт мог бы претендовать на роль СК, так как способен дифференцироваться как в гепатоциты, так и в клетки желчных протоков. Но в связи с тем, что гепатобласты неспособны к самовозобновлению и кратковременно пребывают в недифференцированном состоянии, эти клетки не могут быть отнесены к СК печени. В связи с этим следует полагать, что гепатобласты являются самыми ранними коммитированными эндодермальными клетками печени в развивающемся зародыше.

Сведения о сигналах, вызывающих развитие эндодермы печени на различных стадиях эмбриогенеза, немногочисленны (табл. 23.1). Установлено, что после экспозиции эндодермы *ex vivo* с FGF-4 в ней выявляется экспрессия некоторых печеночных маркеров [Wells, Melton, 1999]. У мышей со стадии E8, 5 из преобразованной эндодермы начинает формироваться кишечная трубка, в клетках которой проявляется экспрессия ядерного фактора гепатоцитов-3β (HNF-3β) [838; Zaret, 1996]. Предполагают также большое значение для индукции эндодермы передней кишки в клетки печеночной линии кислого и щелочного FGF, место образования которых находится в соседней сердечной мезодерме [Jung, et al., 1999; Rossi, et al., 2001]. В этот период появляются костные морфогенетические белки (BMP), образуемые мезенхимой *septum transversum*. Они повышают содержание фактора транскрипции GATA 4, содействующего реакции эндодермы на FGF [Rossi, et al., 2001]. Для печеночной спецификации необходимы GATA-4 и HNF-3β. Эти факторы являются важными эффекторами процессов, приводящих к дифференцировке гепатоцитов и появлению в них маркеров специфической экспрессии, в частности, альбумина. В средней стадии гепатогенеза и после нее существенное значение для развития гепатоцитов плода имеет фактор роста гепатоцитов (HGF), который секретируется окружающими мезенхимальными клетками [420]. На стадии E12-E16 печень плода мыши становится главным местом гемопоэза [Kinoshita, et al., 1999]. Во время этого периода кроветворные клетки образуют онкостатин М (OSM), вызывающий созревание гепатоцитов плода [Kamiya, et al., 1999]. Трансформирующий фактор роста-β (TGF-β) стимулирует образование альбумина пренатальными гепатоцитами, способствуя регуляции дифференцировки печени. Росту печеночной почки способствуют также сосудистые эндотелиальные клетки. На поздней стадии гестации или при рождении начинают выявляться метаболические ферменты, экспрессированные во взрослой печени, такие как тирозинаминотрансфераза (ТАТ), глюкоза-6-фосфатаза (Г6Ф) и карбамилфосфатсинтетаза.

Таблица 23.1

Ростовые факторы, участвующие в развитии печени плода

Этап развития	Клетки	Внеклеточные факторы	Внутриклеточные факторы
Ранний	Мезодерма сердца	FGF1, FGF2, FGF8	GATA 4
	Мезодерма эмбриональной поперечной перегородки (<i>Septum transversum</i>)	BMP 4	
	Эндотелий сосудов	-	
Средний	Мезенхима	HGF	sek 1; c-jun
Поздний	Кроветворные клетки	Онкостатин М,	c/EBPa; HNF4

Во время развития плода печень временно становится главным местом кроветворения. По какой причине печень во время развития плода временно становится главным местом кроветворения, не совсем ясно. Чем объяснить специфический хоуминг ГСК в печень плода? Некоторые авторы попытались определить, какое микроокружение клеток печени плода способ-

ствует развитию гемопоэза. Роль паренхиматозных клеток фетальной печени в поддержании гемопоэза была выявлена еще в опытах по органотипическому культивированию гемопоэтической ткани. Е. А. Лурия [Лурия, 1972] было показано, что при органотипическом культивировании эмбриональной печени мышей очаги кроветворных клеток располагались на местах, где сохранялась структура печеночной ткани. На рис. 23.1 приведена типичная морфология печени плода человека первого триместра гестации [Петренко Ю. А. и др., 2011]. Видно, что в препарате присутствуют, в основном, клетки двух типов: мелкие темные гемопоэтические клетки и гепатические — большие клетки с крупным ядром. Взаимное расположение этих двух типов клеток предполагает их тесное функциональное взаимодействие. Автором работы [Лурия, 1972] сделан вывод, что длительное поддержание кроветворения в культуре обусловлено влиянием печеночной стромы, которая оказывает на гемопоэтические клетки специфические гистогенетические воздействия.

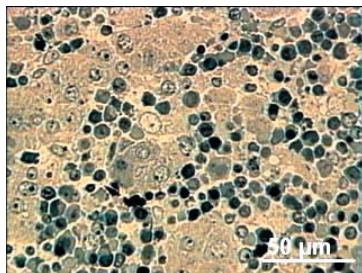


Рис. 23.1. Типичная морфология печени плода человека 8–9 недель гестации. Окраска толуидиновым синим

В дальнейших исследованиях было обнаружено, что поддержанию кроветворной стромы печени плода благоприятствует популяция со смешанными эндодермально-эпителиальными и мезодермальными свойствами. Во время активной фазы кроветворения клетки стромы печени плодов мыши и человека экспрессируют как мезенхимальные (виментин, остеоопонтин, коллаген I, актин гладких мышц, тромбоспондин-1, ED α -фибронектин, кальпонин, антиген Stro 1, миоцитарный стимулирующий фактор 2с), так и эпителиальные (α -ФП, цитokerатины –8 и –18, альбумин, Е-кадерин, HNF-3 β) маркеры. Такой особенностью, наблюдаемой во время развития, обладает популяция клеток, находящаяся в стадии перехода от эпителия к мезенхиме (клетки СПЭМ). Микроокружение печени плода во время кроветворной фазы обеспечивается популяцией клеток СПЭМ, обладающих способностью содействовать кроветворению, тогда как позже содержание этой популяции клеток снижается, что и наблюдается в некроветворной печени к концу гестации и у взрослых. Предшественниками клеток СПЭМ являются, вероятно, эндодермальные или мезенхимальные СК печени или циркулирующие ГСК, заселяющие зачаток печени [Chagraoni, et al., 2003].

Гепатобласты, образующиеся из эндодермы к началу печеночной дифференцировки, в отличие от гепатоцитов, не экспрессируют или экспрессируют в малой степени ряд мембранных антигенов гепатоцитов. Вместе с тем, они экспрессируют α -ФП, инсулиноподобный фактор роста-2 (IGF), IGF-связывающие белки и несколько рибосомных белков, не обнаруживаемых в гепатоцитах. В процессе созревания в клетках появляется экспрессия протеаз (например, катепсина L), белков острой фазы (например, орозомукоида), ферментов, вовлекаемых в обмен метаболитов (например, никотинамид метилтрансферазы), глюкозидов (например, Г6Ф) и аминокислот (например, ТАТ), характеризующих различные функции обмена печени. Наконец, другие белки, такие как альбумин, цитокератины-8 и -18, выявляемые в гепатобластах, также экспрессируются в гепатоцитах.

Одним из факторов, ответственных за созревание гепатоцитов, является онкостатин М (OSM) [Kamiya, et al., 1999; Kinoshita, et al., 1999; Kinoshita, Miyajima, 2002]. Клетки плодов мышей, длительно культивируемые без OSM, были похожи на клетки СПЭМ: они имели

овальную форму, не преломляли свет при микроскопии, экспрессировали α -ФП, актин гладких мышц и цитокератин-8 (но не ЦК-18). Эти клетки были окружены кроветворными клетками, имеющими меньшие размеры, круглую форму, преломляющими свет и экспрессирующими CD45. В культурах, поддержанных OSM, кроветворных клеток не обнаруживали. Эти культуры состояли из клеток, содержащих ЦК-8 или ЦК-18 и имеющих в цитоплазме низкий уровень α -ФП при высоких уровнях альбумина [Chagraoni et al., 2003]. Таким образом, добавление в среду культивирования OSM приводит к исчезновению кроветворных клеток и замещению клеток СПЭМ гепатоцитами и миофибробластами, воспроизводящими картину, наблюдаемую во время развития печени плода в период перехода от выраженного кроветворения до конца гестации [Kamiya, et al., 1999; Kinoshita, et al., 1999]. На клетках стромы печени (линия AFTO24) обнаружили, что после их обработки OSM в течение 5–10 дней отмечается повышение экспрессии альбумина, Е-кадгерина, исчезает α -ФП, перестает определяться α -актин гладких мышц и снижаются все другие мезенхимальные маркеры. Такие же изменения происходят в некроветворной печени в конце гестации.

Последовательность событий, происходящих при развитии печени, может быть следующей. Кроветворные клетки из желточного мешка и региона AGM мигрируют в зачаток печени, в котором обнаруживают клетки СПЭМ. Клетки СПЭМ обеспечивают благоприятное микроокружение для заселения печени кроветворными клетками и их дальнейшего развития. Кроветворные клетки продуцируют OSM, и их экспансия в процессе установления кроветворения в печени приводит к локальному повышению концентраций этого цитокина. В результате уровень OSM становится достаточным для индукции в печени созревания гепатобластов. Кроме того, OSM оказывает ингибирующий эффект на гемопоэз. В результате гемопоэтическая функция плодовой печени постепенно снижается, а гепатическая дифференцировка нарастает.

Трансплантация фетальных клеток печени может рассматриваться в качестве перспективного метода лечения ряда врожденных и приобретенных заболеваний. Эти клетки демонстрируют высокий пролиферативный потенциал в системах *in vitro* и *in vivo* [Cantz, et al., 2008]. При трансплантации крысам с частичной гепатэктомией (ГЭ) они образуют кластеры из 500–1000 клеток и ускоряют регенерацию печени. Так, в наших исследованиях было показано [Моисеева и др., 2001, Оченашко и др., 2002], что введение криоконсервированных клеток фетальной печени одновременно с 70 %-ной ГЭ в 2,5 раза увеличивало скорость синтеза ДНК в печени через 24 часа после операции. Параллельно наблюдалось дополнительное увеличение массы печени в ходе регенерации на 23 %, 33 % и 20 % через 24,48 и 72 часа, соответственно. Функция введенных клеток на модели частичной ГЭ может быть оценена лишь в первые несколько суток, поскольку масса печени практически полностью восстанавливается через 7 суток. Однако известно, что в случае приживления трансплантированных клеток через 6 месяцев они репопулировали 6–10 % печени крыс после частичной ГЭ [Cantz, et al., 2008]. Причем при ингибировании пролиферации гепатоцитов до проведения частичной гепатэктомии с помощью, например, ретрорсина, эффективность репопуляции достигала 80 % [Sandhu, et al., 2001].

На моделях хронической печеночной недостаточности (цирроз, алкогольное поражение печени и др.) было убедительно показано частичное восстановление структуры и функции печени после трансплантации фетальных клеток [Ochenashko, et al., 2006, Грищенко и др., 2010]. Эти и многие другие исследования свидетельствуют о возможности функциональной коррекции патологий печени, связанных с дефицитом гепатоцитов путем клеточной терапии фетальными клетками. В ряде стран, в том числе и в Украине, проводятся клинические испытания препаратов фетальных клеток печени для лечения гепатических, гематологических, эндокринных и других патологий [8, Демин Ю. А., Петренко А. Ю., 2001, Литовченко В. О., 2002]. Однако этические проблемы, связанные с использованием абортивного материала для приготовления препаратов, осложняют и ограничивают проведение этих испытаний.

23.2. Резидентные стволовые клетки печени взрослых млекопитающих

23.2.1. Дифференцированные гепатоциты и регенерация печени

Гепатоциты представляют собой окончательно дифференцированные клетки, составляющие 90–95 % массы печени — самого крупного из внутренних органов организма. В гепатоцитах осуществляется биотрансформация и аккумуляция энергии, биodeградация токсических компонентов, синтез многих белков крови, секреция желчи и липопротеидов и другие функции. Кроме гепатоцитов в печени присутствуют другие клеточные популяции — эпителиальные клетки желчных протоков (холангиоциты, ХЦ), клетки эндотелия, клетки Купфера (КК — макрофаги в печеночных синусоидах) и клетки Ито, функцией которых является накопление витамина А и синтез белков соединительной ткани). Все эти клетки в печени взрослого человека организованы в структурно-функциональные единицы — печеночные дольки, состоящие из 400–600 гепатоцитов.

На рис. 23.1. приведена схема строения печеночной дольки. Видно, что каждая долька расположена вокруг центральной вены (ЦВ) и окружена по периферии прослойками соединительной ткани, содержащими портальные триады. Портальные триады состоят из 3-х сосудов: портальной вены (ПВ), печеночной артерии (ПА) и желчного протока (ЖП). Паренхима печеночной дольки оказывается в различных условиях трофики и обеспечения кислородом, что позволяет выделить в ней две зоны: перивенозную и перипортальную.

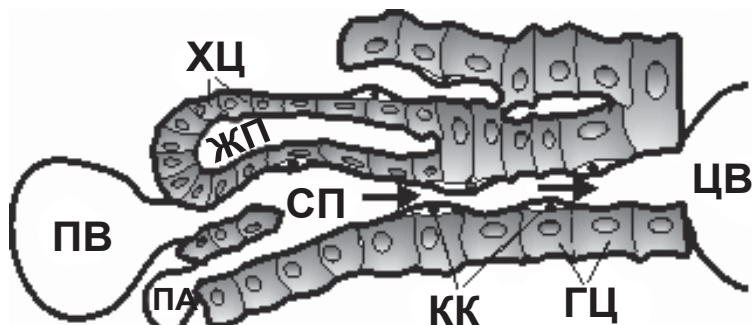


Рис. 23.2. Схема строения печени

Обозначения: ЦВ — центральная вена, ПВ — портальная вена, ПА — печеночная артерия, ЖП — желчный проток, КК — клетка Купфера, ГЦ — гепатоцит, ХЦ — холангиоцит, СП — синусоидальное пространство. Стрелками отмечено направление движения крови.

В нормальной печени скорость клеточного обновления очень низка — в состоянии митоза находятся всего 0,1–0,01 % гепатоцитов. Поэтому считается, что клетки нормальной печени находятся вне клеточного цикла, т. е. в G_0 фазе [Полищук А. М., 1983]. Однако печень обладает удивительной способностью поддерживать число паренхиматозных клеток на постоянном уровне [100]. Эта способность наиболее ярко проявляется при частичной резекции и токсическом повреждении печени. Классической экспериментальной моделью регенерации печени является резекция 2/3 ее массы (70 %-ная гепатэктомия, ГЭ). Восстановление массы печени при таком воздействии происходит в течение 1–2 недель за счет деления оставшихся гепатоцитов. Пролиферация гепатоцитов активируется в области портальных триад уже через 12–14 часов после ГЭ, постепенно распространяется к центру дольки и достигает своего пика к 24 часам [Kay, Fausto, 1997].

Пик пролиферации гепатоцитов после частичной ГЭ сопровождается репликацией эпителиальных клеток желчных протоков, Купферовских клеток печени (макрофагов), звездчатых клеток (клеток Ито) и, наконец, эндотелиальных клеток [Michalopoulos, DeFrances, 1997]. Изучение меченя ДНК показало, что через 24 ч. после частичной ГЭ все гепатоциты входят в S-фазу клеточного цикла и пик синтеза ДНК отмечается приблизительно к 48 ч. [обзор 100]. Было установ-

лено, что увеличение синтеза ДНК после частичной ГЭ обусловлено главным образом восстановлением повреждений ДНК без цитокинеза и гиперплазии [Zajicek, 1991].

В регенерации печени участвуют следующие биомолекулы: фактор роста гепатоцитов (HGF), трансформирующий фактор роста-альфа (TGF- α), эпидермальный фактор роста (EGF), инсулин, фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкин-6 (IL-6), факторы транскрипции: NFkB, STAT3, C/EBP α , C/EBP β , гомо- или гетеродимеры, составляющие комплекс транскрипции AP-1, и др. HGF и TNF- α являются главными инициаторами регенеративного процесса. Быстрое нарастание уровня HGF в крови отмечается в течение первого часа после частичной ГЭ, и этот уровень остается повышенным на протяжении 72 часов [100]. Такое стремительное увеличение не может быть объяснено синтезом *de novo*, и предполагают, что частичная ГЭ вызывает ремоделирование ЭКМ в печени с освобождением HGF, хранящегося в этом матриксе [Kim, et al., 1997]. Образование TNF- α в печени максимально повышается через 48 ч. после частичной ГЭ и зависит от функции клеток Купфера [Iwai, et al., 2001]. Подтверждение важной роли TNF- α в регенерации печени было получено из наблюдения, что антитела к TNF- α подавляют регенерацию печени [Akerman, et al., 1992]. Большая часть регенеративных свойств TNF- α обусловлена его способностью стимулировать образование IL-6 звездчатыми клетками печени и макрофагами (рис. 23.2).

Таким образом, TNF- α , который цитотоксичен для культивированных гепатоцитов и индуцирует освобождение из митохондрий активных форм кислорода, стимулирует репаративный процесс после частичной ГЭ [100]. Эти данные пытались объяснить, хотя бы частично, тем, что TNF- α индуцирует гены выживания, отменяющие антипролиферативные стимулы [Diehl, 2000]. Один из таких факторов — антиапоптозный фактор транскрипции — ядерный фактор каппа В (NFkB), содержание которого возрастает в течение 15 мин. после частичной ГЭ [Cressman, et al., 1994]. Более того, подавление NFkB во время печеночной регенерации приводит к апоптозу, вызываемому TNF- α [Iimuro, et al., 1998]. IL-6, зависимый от TNF- α , индуцирует несколько антиапоптозных белков, включая Bcl-2, Bcl-X_L и белок FLIP, взаимодействующий с лигандом Fas [Kovalovich et al., 2001], а также стимулирует образование индуцибельной NO-синтазы (iNOS), защищающую гепатоциты от потенциально токсических эффектов повышенных уровней TNF- α [100].

Изолированные зрелые гепатоциты в первичной культуре проявляют ограниченную репликацию. Даже после 70 % частичной ГЭ зрелые гепатоциты делятся только однократно или дважды и затем возвращаются в состояние покоя [Fausto, 2000]. Однако при некоторых патологических состояниях зрелые гепатоциты могут иметь необычно высокий репликативный потенциал. Например, у мышей линии AluPA, несущих ген урокиназы, активатора плазминогена, под промоторм альбумина, при рождении наблюдается обширное повреждение печени. Оно связано с тем, что с началом синтеза альбумина в клетках печени начинается несвойственная им экспрессия урокиназы и образуется плазмин, повреждающий гепатоциты [660]. Трансплантация таким мышам крайне малого числа сингенных или ксеногенных гепатоцитов (2×10^5 клеток) вызывала репопуляцию поврежденной печени после 12–18 циклов клеточного деления [Rhim, 1994]. Наибольшее впечатление производит следующий эксперимент: мышам с тирозинемией (модели повреждения печени) трансплантировали гепатоциты самцов (идентифицированные по наличию Y-хромосомы); эти гепатоциты серийно ретрансплантировали восьми самкам и наблюдали после 69 клеточных делений репопуляцию печени у всех самок [Overturf, et al., 1997]. Следует отметить, что выявленный в этих работах необычайно высокий репопуляционный потенциал гепатоцитов может быть завышен, в связи с возможным присутствием в вводимой суспензии других стволовых клеток, например овальных или ГепСК.

Способность гепатоцитов к делению в экстремальных ситуациях дала основание некоторым авторам рассматривать их в качестве претендентов на роль СК во взрослой печени [744]. Но, несмотря на удивительную способность к поддержанию на постоянном уровне числа паренхиматозных клеток, высокая степень дифференцировки, низкая активность или отсутствие теломеры не позволяет отнести гепатоциты к СК [Петренко и др., 2003, Урываева, 2009].

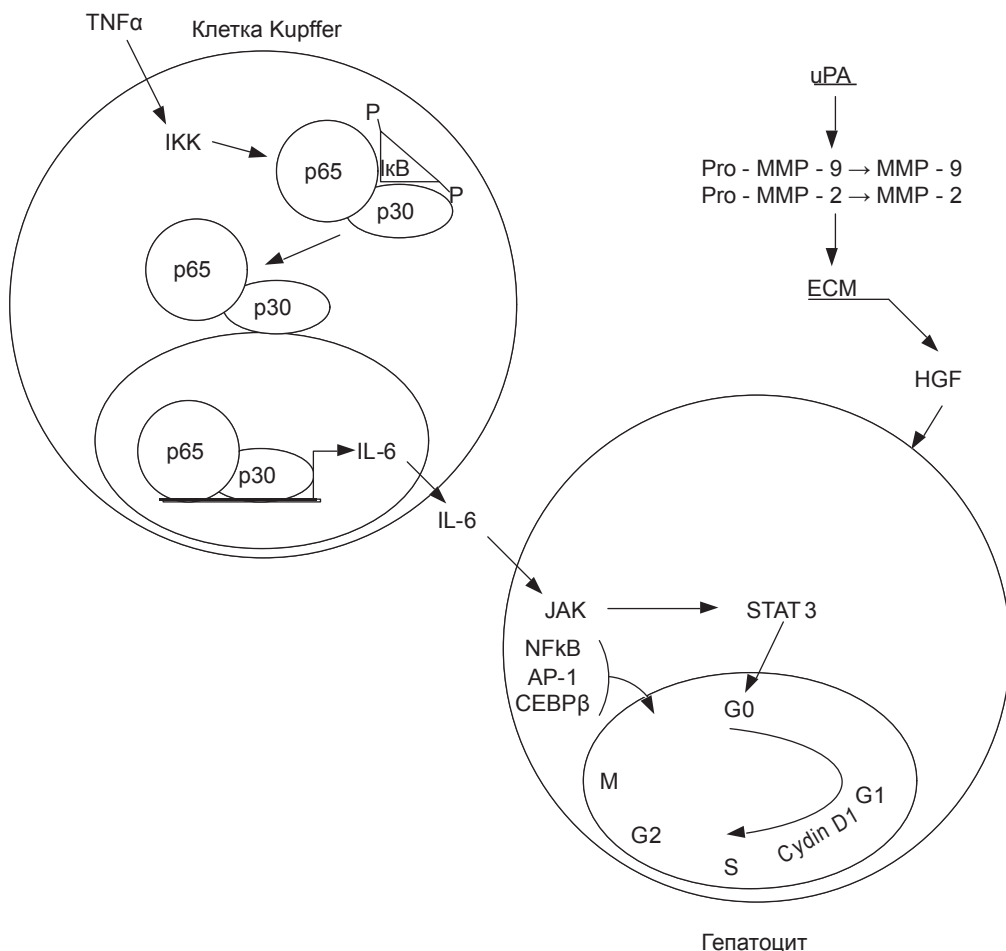


Рис. 23.3. Взаимодействие клеток Купфера, экстраклеточного матрикса (ЭКМ) и гепатоцитов во время регенерации печени

Под влиянием TNFα в клетках Купфера стимулируется активность киназы (IKK) ядерного фактора каппа В (NFκB), которая вызывает фосфорилирование и разрушение IκB— антиапоптозного фактора транскрипции. Из этого фактора освобождаются гетеродимеры (p65 и p50), перемещающиеся в ядро и индуцирующие транскрипцию IL-6. В гепатоцитах IL-6 содействует активности молекулярного комплекса JAK/STAT3, который, взаимодействуя с NFκB, AP-1 (транскрипционный комплекс) и C/EBPβ (транскрипционный фактор, необходимый для глюконеогенеза и пролиферации клеток), инициирует вхождение клетки в цикл и дальнейшее развитие. Одновременно активатор плазминогена урокиназы (uPA) активирует металлопротеиназы матрикса (MMP-9 и MMP-2), которые освобождают фактор роста гепатоцитов (HGF), действующий как митоген на гепатоциты. По Black, et al. [100].

23.2.2. Овальные клетки как стволовые клетки печени

Предположение о существовании внутripеченочной популяции СК для регенерации гепатоцитов было впервые сделано в начале 60-х годов прошлого века. Было обнаружено, что при умеренном или тяжелом повреждении печени, вызвавшем потерю большого числа гепатоцитов и сопровождающимся прекращением деления оставшихся под действием гепатотоксинов или карциногенов, в перипортальных регионах печени поблизости от желчных путей обнаруживается пролиферация овальных клеток [Golding, et al., 1995; Paku, et al., 2001]. Это небольшие клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, у которых ядро имеет отчетливую овоидную форму, определившую название клеток. Они пролиферируют в виде клонов и обладают

потенциальной способностью дифференцироваться как в гепатоциты, так и в эпителий желчных протоков, клетки панкреатических линий и кишечника [Oh, et al., 2002; Theise, et al., 1999]. Относительно недавно была выявлена также способность овальных клеток дифференцироваться в инсулинпродуцирующие клетки ПЖ, которые при трансплантации снижали уровень глюкозы у мышей с диабетом [819]. Большинство исследователей считают, что овальные клетки постоянно находятся в самых мелких разветвлениях билиарного дерева — канальцах Геринга, которые анатомически представляют конечные желчные протоки [Fausto, Campbell, 2003; Theise et al., 1999; Zhang et al., 2003]. При дифференцировке в гепатоциты овальные клетки первоначально превращаются в базофильные небольшие гепатоциты, а затем уже в зрелые [Golding, et al., 1995].

Происхождение овальных клеток дискутируется в литературе. Большинство исследователей считают, что овальные клетки постоянно находятся в самых мелких разветвлениях билиарного дерева — канальцах Геринга, которые анатомически представляют конечные желчные протоки [Fausto, Campbell, 2003; Theise, et al., 1999; Zhang, et al., 2003]. В то же время некоторые авторы полагают, что, по крайней мере, часть овальных клеток может происходить из клеток КМ [Alison, et al., 2000; Germain, 1988]. Другие исследователи отрицают происхождение овальных клеток из КМ и считают, что предшественниками этих клеток могут быть эпителиальные клетки желчных протоков или еще не изученные перидуктулярные клетки [231]. Такая точка зрения поддерживается данными, что овальные клетки экспрессируют маркеры холангиоцитов [670; Hu, et al., 1993; Nixson, et al., 1990] и могут формировать структуры, подобные желчным протокам, соединяющимся с имеющимися холангиоцитами. Возможность происхождения овальных клеток из зрелых клеток желчных протоков с сохранением потенциала этих клеток для дифференцировки в гепатоциты поддерживается наблюдениями Sirica и соавторов [Sirica et al., 1990]. Эти исследователи после наложения лигатуры на желчный проток крысы и обработки животного CCl₄ или фураном выявляли внутри желчного протока редкие дуктулярные гепатоциты. Имеются также работы, в которых описывалось появление клеток, подобных овальным клеткам, при заболеваниях печени у человека [Crosby, et al., 1998].

Для определения судьбы овальных клеток применяют обычно антигены гепатоцитов, холангиоцитов и овальных клеток (BSD7, OC2, OC3, OV-1 и OV-6); цитокератины (-8, -18 и -19); ферменты и белки (α -ФП, GGT) [Germain, et al., 1988; 744]. Также было показано, что овальные клетки экспрессируют такие хорошо известные маркеры кроветворных клеток, как Thy-1, CD34, c-kit и Flt-3 [Fujio, et al., 1994; 588]. Выделив достаточно чистую (95–97 %) популяцию Thy-1⁺ клеток печени авторы работы [588] показали, что эти клетки, кроме Thy-1, экспрессируют и другие традиционные маркеры овальных клеток, такие как α -ФП, цитокератин-19, GGT, OC2 и OV-6. Однако эти клетки не экспрессировали десмин, являющийся клеточным маркером звездчатых клеток. При трансплантации крысам овальных клеток наблюдается их пролиферация и дифференцировка их в зрелые гепатоциты [175].

Активация овальных клеток является результатом тонко регулируемой последовательности событий, происходящих во время регенерации печени [Oh, 2002]. Процесс начинается с образования в поврежденной печени хемокина стромального фактора 1 (SDF-1). Благодаря хемотаксическому градиенту, в место повреждения рекрутируются CXCR4⁺ СК КМ, обладающие рецепторами CXCR4 для хемокина SDF-1 [Oh, 2002]. В печени прогениторные клетки вступают в контакт с другим хемокином — SCF (фактором стволовых клеток), стимулирующим мобилизацию СК [Fujio, et al., 1994]. Одновременно происходит разрастание звездчатых клеток в перипортальных регионах печени со стимуляцией образования таких ростовых факторов, как HGF и TGF- α [Lenzi, et al., 1992]. Было установлено, что HGF действует как активный промотор дифференцировки клеток печеночных линий [Oh, 2002]. Также отметили, что овальные клетки и СК КМ экспрессируют рецептор HGF c-Met [Zarnegar, Mishalopoulos, 1995]. Другую возможность пролиферации СК в местах повреждения обеспечивают звездчатые клетки, увеличивающие образование растворимого фибронектина — молекул экстраклеточного матрикса [278]. Наряду с инициацией синтеза ДНК в OV-позитивных и десмин-позитивных клетках портального тракта

в этих клетках повышается экспрессия ростовых факторов α -TGF, HGF, α FGF и TGF- β , которые продолжают экспрессироваться на высоких уровнях в течение всего периода экспансии и дифференцировки овальных клеток [Lenzi, et al., 1992]. Известно, что TGF- β и TNF подавляют дифференцировку прогениторных кроветворных клеток в мегакариоциты и миелоциты. Возможно, что действуют еще какие-то помощники в осуществлении процессов хоуминга, разрастания и дифференцировки овальных клеток на заключительном этапе их участия в регенерации печени [Oh, 2002]. Эти факторы могут быть сигналами, способствующими дифференцировке овальных клеток в печеночную линию. Будущие исследования должны прояснить роль взаимодействия гепатоцитов, кроветворных и овальных клеток в процессе регенерации печени.

Таким образом, по всем свойствам овальные клетки в большей степени, чем гепатоциты, соответствуют критериям СК: они слабо дифференцированы, способны к пролиферации и образованию двух—четырёх типов дифференцированных потомков. Их можно отнести к СК, так как в состоянии покоя они не делятся, но в определенных условиях эта функция проявляется в полной мере. Однако в настоящее время мало данных о способности овальных клеток к самообновлению, что позволяет их классифицировать не как истинные СК, а как клетки-предшественники.

Во многих случаях регенерации печени, независимо от участия в этом процессе овальных клеток, на начальных этапах наблюдается увеличение числа жиронакопительных клеток Ито и их пролиферация [Paku, et al., 2001]. Киясов с сотрудниками установили, что у крыс клетки Ито могут совершать мезенхимально-эпителиальную трансформацию и экспрессировать маркеры гепатоцитов и овальных клеток (ГГТ, цитокератин-8 и α -ФП). Авторы пришли к заключению, что выявленные ими факты позволяют рассматривать клетки Ито как СК печени [Киясов и др., 2006].

23.2.3. Гепатические стволовые клетки

В ряде исследований из печени человека и животных были выделены гепатические клетки-предшественники, которые не экспрессировали маркеры вышеописанных претендентов на СК печени. Авторы работы [Zheng, et al., 2002] из печени зародыша мыши выделили колониеобразующие единицы (hepatic colony-forming unit, HCFU), способные к самообновлению, которые характеризовались фенотипом c-Met⁺CD49^{hi/low}, c-kit⁺, CD45⁺, TER119⁺. В течение первых 14 дней культивирования эти клетки не несли специфических маркеров ни гепатоцитов, ни холангиоцитов; они обнаруживались позже, только на 21-й день. Методом ПЦР было показано, что колониеобразующие единицы в этот срок могут экспрессировать также инсулин, глюкагон и соматостатин, являющиеся маркерами β -, α - и δ -клеток поджелудочной железы (ПЖ), соответственно. При трансплантации иммунодефицитным мышам HCFU образовывали не только гепатоциты и клетки желчных протоков, но и эпителиальные клетки ПЖ и желудка. На основании приведенных данных HCFU можно принять за гепатические стволовые клетки (ГепСК) с высоким мультилинейным дифференцировочным потенциалом, распространяющимся на многие эндодермальные клеточные типы. Однако [Zheng, et al., 2002] пришли к заключению, что ГепСК существуют в печени лишь в очень ранние сроки ее развития (у мыши до 13,5 дня, что соответствует примерно 12 неделям гестации у человека), а затем исчезают.

Вместе с тем, в последующих работах удалось выявить клетки с подобными свойствами в печени человека и животных после рождения [Schmelzer, et al., 2007, Tsuchiya, et al., 2007, Duret, et al., 2007]. Авторы работы [Tsuchiya, et al., 2007] описали колониеобразующие единицы гепатических клеток в печени взрослых мышей, которые были способны образовывать большие (более 200 клеток) колонии. Для анализа были взяты образцы печени 4-, 8- и 12-месячных мышей. Оказалось, что количество HCFU снижается с возрастом: если у 4-месячных мышей их количество составляло около 40 % от уровня, выявляемого у мышинных эмбрионов (E13, 5), то у 8-месячных — 20 %, а у 12-месячных — HCFU обнаружить не удалось. Гепатические колониеобразующие клетки были способны к долговременной экспансии в бессывороточной культуре в присутствии HGF, FGF и EGF. Причем HCFU 4-месячных крыс сохраняли колониеобразую-

щую активность в течение более чем 30 пассажей, а 8-месячные теряли способность к экспансии после 20-го пассажа.

Фенотипический анализ клеток колоний после экспансии показал их гетерогенность: в популяции встречались клетки со свойствами гепатобластов (α -ФП-позитивные), которые экспрессировали CD49f^{low}, но не CD45, CD34, Thy-1, c-kit, CD31 и flk-1. Экспрессия этих маркеров свидетельствует о принадлежности этих постнатальных клеток к ГепСК, выявленных ранее в фетальной печени [Zheng, et al., 2002]. Более того, Tsuchiya и др. удалось показать, что способностью к самообновлению и двулинейной дифференцировке обладают клетки боковой популяции (SP) и Sca-1-позитивные клетки. С целью определения локализации ГепСК в постнатальной печени был проведен иммунохимический анализ клеток, экспрессирующих Sca-1 и ABCG2 (маркер клеток SP). Было показано, что в нормальной печени 4-месячных мышей ABCG2 экспрессируется в некоторых гепатоцитах, а Sca-1 — в небольшом количестве эндотелиальных клеток портальной зоны. В регенерирующей печени экспрессия Sca-1 и ABCG2 была выявлена в разных клетках, расположенных в канальцах Геринга, которые, очевидно, служат нишей ГепСК.

В печени человека также были выявлены клетки со свойствами ГепСК [Duret, et al., 2007]. После экспансии они демонстрировали способность к дифференцировке в гепатоциты и холангиоциты, но фенотипически отличались от гепатобластов и овальных клеток.

Используя для идентификации ГепСК уникальные маркеры незрелых эндодермальных клеток, авторы работы [Schmelzer, et al., 2007] исследовали образцы печени зародыша, новорожденного человека, а также взрослых доноров. В качестве потенциальных маркеров ГепСК авторы использовали ЕрСAM и NCAM. ЕрСAM — молекула адгезии эпителиальных клеток, которая присутствует в нормальных эпителиальных клетках эндодермального происхождения (легких, печени, ПЖ, кишечнике), находящихся в состоянии активной пролиферации. В норме гепатоциты не синтезируют белок гена ЕрСAM, но при некоторых патологиях, например, циррозе, наблюдается его экспрессия, что, очевидно, отражает активацию стволовых клеток. NCAM — молекула адгезии нейральных клеток-предшественников. Было показано, ЕрСAM экспрессируется в ГепСК и гепатобластах, но не в зрелых гепатоцитах и холангиоцитах, NCAM — только в ГепСК, но не в остальных исследованных источниках.

Таким образом, в соответствии с данными [Schmelzer, et al., 2007], ГепСК представляет собой СК печени, которая является предшественником как фетальных гепатобластов, так и зрелых клеток. В отличие от гепатобласта, имеющего фенотип ЕрСAM⁺, α -ФП⁺, ГепСК не экспрессирует α -ФП. При этом фенотип гепатобластов, которые, по мнению авторов, являются аналогами овальных клеток в постнатальной печени, представляет собой переходную форму между ГепСК и зрелыми клеточными элементами печени. ГепСК в течение всего онтогенеза сохраняет свой уникальный фенотип, при этом проявляя слабую экспрессию альбумина и ЦК 19, что указывает на его бипотентность.

ГепСК обладают еще рядом свойств, присущим СК, таким как высокая активность теломеразы, экспрессия c-kit и белков сигнальной системы Hedgehog, способность к самообновлению, сохраняясь на стабильном уровне в течение всей жизни. Кроме того, при трансплантации иммунодефицитным мышам ГепСК дают начало росту зрелых гепатоцитов и холангиоцитов.

Идентификация и исследование ГепСК свидетельствуют о том, что эти клетки могут явиться основой для клеточной терапии заболеваний печени.

23.3. Образование клеток печени из внегепатических стволовых клеток

23.3.1. Дифференцировка стволовых клеток костного мозга в клетки печени

Работы по исследованию эндогенного источника СК печени продолжают до сих пор, но не менее интенсивно развиваются альтернативные гипотезы происхождения СК печени. Впервые Petersen и др. [588] продемонстрировали дифференцировку ГСК КМ в эпителиальные клетки немезенхимального происхождения. Эксперименты были проведены на самках крыс, у которых

повреждение печени вызывали обработкой тетрахлорметаном, а пролиферацию собственных гепатоцитов ингибировали 2-ацетиламинофлуореном (2-AAF). Механизм действия 2-AAF основан на том, что он метаболизируется исключительно в гепатоцитах, а N-гидроксильные продукты его биотрансформации блокируют способность гепатоцитов пролиферировать в ответ на токсическое повреждение или частичную ГЭ. Через 2 недели после трансплантации ГСК самцов у небольшого числа гепатоцитов и овальных клеток самок-реципиентов были обнаружены донорские Y-хромосомы. Авторами было высказано предположение о возможности трансдифференцировки клеток КМ в гепатоциты. Lagasse и др. [419], применив линию трансгенных нокаутных мышей с врожденной болезнью печени, соответствующей тирозинемии типа 1 у человека, показали возможность излечения мышей от этой болезни, приводящей к гибели животных, путем трансплантации ГСК нормальных сингенных животных. Более тщательная проверка данных, описанных в этой работе, показала, что основную роль в регенерации печени животных может играть слияние клеток, а не трансдифференцировка. Schwartz и др. [669] из нормального КМ человека выделили примитивные мультипотентные прогениторные клетки, которые были способны *in vitro* дифференцироваться во все эпителиальные линии, в том числе в эпителий печени, а также в большинство мезодермальных и нейроэктодермальных клеток. Иммунофлуоресцентным методом было показано, что костномозговые клетки-предшественники печеночных клеток экспрессируют маркеры, специфические для печени, а именно альбумин и САМ 5.2. Методом PCR-RT подтвердили, что эти клетки экспрессируют альбумин и его фактор транскрипции с/EBP. По морфологии и ультраструктуре клетки-предшественники были похожи на гепатоциты. После трансплантации их в печень крыс, подвергнутых небольшой частичной ГЭ (для ускоренного роста пересаженных клеток), наблюдали интеграцию этих клеток с печеночными пластинками и дифференцировку их в зрелые гепатоциты. Особый интерес в этой работе представляет необходимость взаимодействия прогениторных клеток КМ с гепатоцитами для активации предшественников как *in vitro*, так, очевидно, и *in vivo*. Эти данные напоминают в некоторой степени эмбриогенез, во время которого взаимодействие коммитированных энтодермальных клеток с мезенхимальными компонентами примитивной печени является, как отмечалось выше, критическим фактором развития надлежащей клеточной линии.

Несколько наблюдений было сделано в клинике [Alison, et al., 2000; 523], в которых отмечали у женщин реципиентов трансплантатов КМ мужчин появление небольшого числа гепатоцитов, содержащих Y-хромосому мужчин. Авторы работы [Danet, et al., 2002] описали последовательную кроветворную и печеночную дифференцировку ГСК КМ человека, экспрессирующие рецепторы комплемента C1qR_p, после их трансплантации мышам NOD/SCID. Однако попытки других исследователей лечения печеночной недостаточности путем введения клеток КМ к значительному успеху не приводили [Dahlke, Schlitt, 2003]. Предполагают, что для переключения трансдифференцировки (если она вообще возможна) от кроветворной к гепатоцитарной необходимо либо высокое избирательное давление определенного гена (как в случае нокаутных мышей линии FAN), либо значительное время. В последнем случае обнаружить такое сравнительно редкое событие можно только при длительном наблюдении (например, после аллотрансплантации у человека) [176].

Авторы [68] предположили, что общим признаком дедифференцированных гепатоцитов и/или их предшественников может быть отсутствие экспрессии β 2-микроглобулина (b2m). b2m является наиболее консервативной по природе и наименее полиморфной иммунной молекулой, которая выявляется у всех ядерных клеток, начиная с клеток внутренней массы предимплантационной бластоцисты. Не экспрессируют b2m зрелые сперматозоиды человека и крысы, а отсутствие этой молекулы у различных раковых клеток рассматривается как не прямое доказательство происхождения трансформированных клеток из СК. Было обнаружено, что среди b2m-негативных клеток КМ человека и грызунов имеется популяция Thy-1-позитивных клеток, которая экспрессирует специфические для гепатоцитов маркеры и проявляет специфические печеночные функции. После внутрипортального введения таких клеток в печень крыс

они интегрировались в печеночные пластинки и дифференцировались в зрелые гепатоциты. Эта b2m-негативная популяция состояла из небольших (5–8 мкм) бластоподобных клеток с высоким ядерноцитоплазматическим отношением и небольшим числом органелл. Чаще всего такие клетки обнаруживались вблизи портальных триад. В печени новорожденных и 4-дневных крыс b2m-негативных клеток выявляли значительно больше, чем в печени 24-дневных крыс.

Ряд исследователей изучали те клетки, которые составляют так называемую боковую популяцию (Side Population, SP). Клетки SP, происходящие из КМ, могут обеспечить появление как CD45⁺, так и CD45⁻ печеночных клеток, предполагая значительный обмен клетками SP между КМ и печенью [Goodell, et al., 1996; Goodell, et al., 1997; 272]. Гепатоциты из этих субпопуляций, трансплантированные в печень летально облученных мышей, образовывали гепатоциты и холангиоциты, а также обеспечивали восстановление КМ [505]. Фенотип этих клеток был c-kit⁺, Sca1⁺ и CD45⁺, и обычно негативен на CD34. Wagers и Weissman [772], работающие с клетками SP с фенотипом c-kit⁺, Thy-1⁺, Lin-Sca1⁺, отметили менее выраженную пластичность, что может быть объяснено большей коммитированностью их клеток. К сожалению, работ, которые были бы проведены с клетками, представляющими потомство единичных клеток SP печени или КМ, пока не было.

В настоящее время в литературе имеется довольно много данных о содержании в КМ взрослого человека СК, которые могут дифференцироваться *in vitro* в зрелые печеночные фенотипы. Но все эти данные нуждаются в тщательной проверке. В большинстве исследований анализу подвергались неочищенные или недостаточно очищенные популяции клеток. Почти ни в одной из работ не анализировали единичные клетки, что требуется для доказательства мультипотентности.

Авторы работы [Thorgeirsson, Grisham, 2006] проанализировали результаты 77 работ, в которых изучали способность клеток КМ образовывать клетки печени. По мнению авторов, достаточно убедительно процесс трансдифференцировки клеток КМ в клетки печени после трансплантации продемонстрирован не был, а приобретение гепатоцитами фенотипических признаков клеток КМ с большой вероятностью обусловлено слиянием клеток. Это заключение подтверждают авторы работы [Fujino, et al., 2007], использовавшие в качестве объекта трансплантации гемопоэтические клетки кордовой крови человека.

Несмотря на то, что эффективность приживления и длительного выживания в печени клеток КМ остаются предметом обсуждения, недавние данные о существовании в строме КМ клеток с высоким мультилинейным дифференцировочным потенциалом свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований трансплантации СК КМ как метода коррекции патологий печени.

23.3.2. Плюрипотентные стволовые клетки и образование клеток печени

Дифференцировку ЭСК в клетки печени наблюдали *in vitro* в экспериментах, в которых применяли специфические для гепатоцитов цитокины, а также после трансфекции гена HNF-3 β [342]. Было показано, что ЭСК *in vitro* после удаления из среды LIF и еще без добавления ростовых факторов начинают экспрессировать эндодермальные гены, такие как α -ФП, L-антитрипсин, HNF-3 β , альбумин [289]. При наличии в среде ростовых факторов, обязательных для средних (HGF-зависимых) и поздних (OSM-, дексаметазон-, инсулин- и трансферринзависимых) стадий гепатогенеза, экспрессировались такие дифференцировочные маркеры, как ТАТ и Г6Ф, а экспрессия альбумина значительно усиливалась [668]. Данные этих работ были использованы Choi и др. [151] для создания модельной системы дифференцировки ЭСК в гепатоциты *in vivo* в тератомах мышей nude. Однако функциональная активность образующихся гепатоцитоподобных клеток в этом исследовании не была показана. Благоприятный эффект трансплантации ЭСК в подобной системе с повышением выживаемости мышей-реципиентов после повреждения печени CCl₄ был впервые отмечен Yamamoto и др. [815].

Индукцию дифференцировки ЭСК в зрелые гепатоциты можно наглядно воспроизвести при культивировании эмбрионидных телец (ЭТ) с последовательным добавлением тех ростовых факторов, которые имеют большое значение для развития печеночной линии во время эмбрионального развития. В число этих факторов входят кислый FGF (с 9 по 12 день), HGF (с 12 по 18 день)

и OSM, дексаметазон и смесь инсулина, трансферрина и селеновой кислоты (с 15 по 18 день). При культивировании ЭТ с этими ростовыми факторами экспрессия в клетках мРНК альбумина на 18-й день была повышена в 7–9,5 раз по сравнению с ЭТ, культивируемыми без добавления факторов. Кроме того, на 18-й день в опытных ЭТ четко определялись гены G6P и TAT — маркеры созревания гепатоцитов [285]. Надо отметить, что, по данным некоторых авторов, экспрессия TAT выявлялась также в ЭТ, культивируемых без ростовых факторов [149]. Это противоречие может быть объяснено тонкими особенностями линий ЭСК, различными условиями их культивирования или неодинаковыми свойствами используемой ФТС. На основании ряда работ можно заключить, что метод культивирования ЭТ из ЭСК перспективен для изучения развития печени, особенно когда его сочетают с определением экспрессии генов. Но в таких ЭТ содержание предшественников гепатоцитов всегда остается низким независимо от внесения ростовых факторов.

Кроме методов, в которых дифференцировку ЭСК в клетки печеночной линии изучали с использованием ЭТ, обеспечивающих, вероятно, необходимое микроокружение, были разработаны методы, в которых ЭТ применялись минимально или вообще не применялись. Авторы работы [Yin, et al., 2002] использовали промотор α -ФП для выявления печеночных прогениторных клеток среди дифференцирующихся ЭСК. Путем гомологичной рекомбинации ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) был присоединен к эндогенному промотору гена α -ФП, реагирующему на снижение содержания этого маркера. Когда меченые клоны ЭСК индуцировали к образованию ЭТ, в них начинали обнаруживаться GFP-позитивные клетки. Интересно то, что этими исследователями для накопления GFP-позитивных клеток с успехом был использован метод культивирования клеток в метилцеллюлозе, часто применяющийся для дифференцировки кроветворных клеток. С целью повышения выхода печеночных клеток после 6 дней первичного культивирования ЭТ диссоциировали с помощью коллагеназы на отдельные клетки и вновь осуществляли посев в ту же среду, основу которой составляла метилцеллюлоза. После повторных 6 дней культивирования содержание GFP⁺ клеток увеличивалось до 30–50 %. Выделенные GFP⁺ клетки трансплантировали в печень мышей с недостаточностью аполипопротеина E или гаптоглобина. Приживление клеток, происходящих из ЭТ, подтверждалось окрашиванием гена b-gal. Клетки, содержащие этот ген, выявленные в печени реципиентов, показывали положительное иммуногистохимическое окрашивание на альбумин. У мышей-реципиентов с врожденной недостаточностью аполипопротеина этот белок начинал определяться в гепатоцитах и сыворотке. Сходным образом можно было выявить гаптоглобин у трансплантированных мышей с недостатком гаптоглобина. Однако уровни гаптоглобина и аполипопротеина E в сыворотке у мышей-реципиентов были низкие, что связано с низким приживлением (примерно 0,01 %) трансплантированных GFP⁺ клеток в печени животных.

Ishizaka и др. [342] предложили метод получения функционирующих *in vitro* гепатоцитов, не связанный с использованием ЭТ. Авторы получили ЭСК с повышенной экспрессией HNF-3b, клоны которых культивировали в течение месяца в среде α -MEM, содержащей 10 % ФТС, FGF-2, дексаметазон, аскорбат-фосфат и никотинамид, в планшете с круглым дном и узкими сферическими лунками. Сфероиды клеток сохранялись в той же среде, но без FGF-2, зато с добавлением нитей хитина. Содержание альбумина в поверхностных клетках сфероидов определялось иммунохимическим методом. Синтез мочевины в сфероидах был в 3 раза выше, а секреция триацилглицерина была в 70 раз выше аналогичных показателей у первично культивированных ЭСК. Причем функция клеток в сфероидах сохранялась в течение 4-х месяцев.

В качестве другого прямого метода индукции дифференцировки печеночной линии из ЭСК можно привести метод, разработанный и запатентованный корпорацией Geron (патент применения WO 01/81549 A2). По протоколу этого метода ЭСК человека культивировали 4 дня в среде, содержащей 20 % фирменного заменителя сыворотки и 1 % DMSO. В течение последующих 6 дней в среду добавляли 2,5 % бутирата натрия. После окончания культивирования 63 % клеток экспрессировали альбумин и более 80 % из них показывали положительное иммуногистохимическое окрашивание на α 1-антитрипсин. При этом ни одна из клеток не экспрессировала α -ФП.

Методы получения зрелых гепатоцитов из ЭСК постоянно совершенствуются и упрощаются. В частности, разработан одноступенчатый протокол дифференцировки ЭСК в гепатоциты [Dong, et al., 2009], в котором в качестве индукторов использованы вальпроевая кислота, HGF, EGF и инсулин. Полученные таким образом клетки проявляли многие свойства гепатоцитов, включающие специфические паттерны экспрессии генов, поверхностные маркеры, функциональные пробы *in vitro* и способность при трансплантации мышам с острой печеночной недостаточностью частично восстанавливать функцию печени.

Открытые недавно ИПСК (индуцируемые плюрипотентные стволовые клетки) в настоящее время рассматриваются в качестве наиболее привлекательных и общедоступных заменителей ЭСК человека. Уже разработаны двух- и трехэтапные протоколы дифференцировки ИПСК [Song, et al., 2009, Takata, et al., 2011], позволяющие получить функционально активные гепатоциты, способные секретировать альбумин, синтезировать гликоген и мочевины, а также проявлять индуцированную цитохром P450-зависимую биотрансформацию ксенобиотиков.

Резюмируя приведенные данные о дифференцировке плюрипотентных СК в печеночную линию, можно заключить, что гепатоциты, происходящие из этих клеток, способны функционировать в системах *in vitro* и *in vivo*. Однако следует отметить, что до настоящего времени не было продемонстрировано полное излечение заболеваний печени у животных, которым трансплантировали происходящие из них гепатоциты.

Результаты настоящего раздела свидетельствуют о том, что открыт и охарактеризован достаточно широкий арсенал стволовых клеток как эндогенного, так и экзогенного по отношению к печени происхождения, которые имеют перспективу применения в лечении заболеваний печени. При этом очевидным преимуществом будут обладать СК, получение которых будет свободно от этических ограничений, а применение — не требовать иммуносупрессии. Такими свойствами обладают собственные стволовые клетки пациента, дифференцированные в гепатическом направлении.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Грищенко В. И., Ковалев Г. А., Петренко А. Ю. и др. Регенеративно-пластическая терапия алкогольных висцеропатий. — Киев, Наукова думка. — 2010. — 151 с.

Демин Ю. А., Петренко А. Ю. Лечение сосудистой патологии органов зрения трансплантацией криоконсервированных клеток эмбриональной печени // Медицинский международный журнал. — 2001. — 2. — С. 94–96.

Киясов А. П., Гумерова А. А., Титова М. А. Мезенхимально-эпителиальная трансформация клеток Ито *in vitro* // Клет. технологии в биол. и мед. — РАМН, 2006. — Т. 3. — С. 150–153.

Литовченко В. О., Пенделя А. А., Петренко О. Ю. и др. Трансплантација кріоконсервованих гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини в комплексному лікуванні деформуючого артрозу великих суглобів // Врачебная практика. — 2002, 6. — С. 49–51.

Лурия Е. А. Кроветворная и лимфоидная ткань в культурах. — М.: Медицина, 1972. — 176 с.

Моисеева Н. Н., Мазур С. П., Оченашко О. В., Петренко А. Ю. Влияние трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени человека на регенерацию и функции печени крыс после частичной гепатэктомии // Проблемы криобиологии — 2001. — Т. 1. — С. 42–47.

Никитин И. Г. Стволовые клетки печени: современное состояние проблемы // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. — 2004. — № 3. — С. 10–19.

Оченашко О. В., Божков А. И., Петренко А. Ю. Влияние эмбриональных клеток печени человека на синтез ДНК и яРНК в регенерирующей печени крыс // Укр. биохим. журн. — 2002. — Т. 74, № 3. — С. 25–30.

Петренко А. Ю., Грищенко В. И., Оченашко О. В. и др. Трансплантация стволовых клеток — перспективное направление терапии XXI века. 3. Стволовые клетки печени // Международн. мед. журн. — 2003. — Т. 9, № 3. — С. 121–126.

Петренко Ю. А., Грицай Д. В., Говоруха Т. П. и др. Морфологическое исследование клеток фетальной печени человека // Вестник проблем биологии и медицины. — 2011 (в печати).

Полищук А. М. Особенности пролиферации гепатоцитов в растущей и регенерирующей печени // Усп. совр. биол. — 1983. — Т. 96, вып. 3. — С. 451–465.

Урываева И. В. Стволовые клетки в регенерации печени // Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 2 / Под ред. М. А. Пальцева. — Москва: ОАО «Издательство Медицина». — 2009. — С. 211–252.

Akerman P., Cote P., Yang SQ., et al. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy // Am. J. Physiol. — 1992. — Vol. 263. — G579.

Alison M. R., Golding M. H., Sarraf C. E. Pluripotential liver stem cells: Facultative stem cells located in the biliary tree // Cell Prolif. — 1996. — Vol. 29. — P. 373–402.

Alison M. R., Poulson R., Jeffery R., et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells // Nature. — 2000. — Vol. 406. — P. 257–268.

Bisgaard H. C., Nagy P., Santoni-Rugiu E., Thorgerirsson S. S. Proliferation, apoptosis, and induction of hepatic transcription factors are characteristics of the early response of biliary epithelial (oval) cells to chemical carcinogens // Hepatology. — 1996. — Vol. 23. — P. 62–76.

Cantz T., Manns M. P., Ott M. Stem cells in liver regeneration and therapy // Cell Tissue Res. — 2008. — Vol. 331, 1. — P. 271–282.

Chagraoni J., Lepage-Noll A., Anjo A., et al. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition // Blood. — 2003. — Vol. 101, 8. — P. 2973–2982.

Cressman D., Greenbaum L., Haber B., Taub R. Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kB in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 30429.

Crosby H. A., Hubscher S. G., Joplin R. E., et al. Immunolocalization of OV-6, a putative progenitor cell marker in human fetal and diseased pediatric liver // Hepatology. — 1998. — Vol. 28. — P. 980–985.

Crosby H. A., Nijjar S. S., de Goyet J. V., et al. Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage // Semin. Cell Dev. Biol. — 2002. — Vol. 13. — P. 397–403.

Dabeva M. D., Petkov P. M., Sandhu J., et al. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver // Am. J. Pathol. — 2000. — Vol. 156. — P. 2017–2031.

Danet G. H., Luongo J. L., Butler G., et al. C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 10441–10445.

Dahlke M. H., Schlitt H. J. Making hepatocytes from stem cells: where are we? // Liver Transpl. — 2003. — Vol. 9. — P. 1100–1101.

Diehl A. M., Rai R. M. Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration // FASEB J. — 1996. — Vol. 10. — P. 215–224.

Diehl A. Cytokine regulation of liver injury and repair // Immunol. Rev. — 2000. — Vol. 174. — P. 160–168.

Dong X. J., Zhang G. R., Zhou Q. J., et al. Direct hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells induced by valproic acid and cytokines // World J. Gastroenterol. — 2009. — Vol. 15, 41. — P. 5165–5175.

Duret C., Gerbal-Chaloin S., Ramos J., et al. Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver // Stem Cells. — 2007. — Vol. 25, 7. — P. 1779–1790.

Fausto N. Liver regeneration // J. Hepatol. — 2000. — Vol. 32. — P. 19–31.

Fausto N., Campbell J. S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation // Mech. Dev. — 2003. — Vol. 120. — P. 117–130.

Fujino H., Hiramatsu H., Tsuchiya A., et al. Human cord blood CD34⁺ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/gamma(c)null mice through cell fusion // FASEB J. — 2007. — Vol. 21, 13. — P. 3499–3510.

Fujio K., Evarts R. P., Hu Z., et al. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat // Lab. Invest. — 1994. — Vol. 70. — P. 511–516.

Germain L., Blouin M.J., Marceau N. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, AFP, albumin, and cell surface-exposed components // *Cancer Res.* — 1988. — Vol. 48. — P. 4909–4918.

Golding M., Sarraf C.E., Lalani E.N., et al. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver // *Hepatology.* — 1995. — Vol. 22. — P. 1243–1253.

Goodell M.A., Brose K., Paradis G., et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo // *J. Exp. Med.* — 1996. — Vol. 183. — P. 1797–1806.

Goodell M.A., Rosenzweig M., Kim H., et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species // *Nat. Med.* — 1997. — Vol. 3. — P. 1337–1345.

Hixson D.C., Faris R.A., Thompson N.L. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis // *Pathobiology.* — 1990. — Vol. 58. — P. 65–77.

Hu Z., Evarts R.P., Fujio K., et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat // *Am. J. Pathol.* — 1993. — Vol. 142. — P. 1823–1830.

Imuro Y., Nishiura T., Hellerbrand C., et al. NFkappa B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration // *J. Clin. Invest.* — 1994. — Vol. 101. — P. 802–814.

Iwai M., Cui T., Kitamura H., et al. Increased secretion of tumor necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused livers of rats after partial hepatectomy // *Cytokine.* — 2001. — Vol. 13. — P. 60–69.

Jung J., Zheng M., Goldfarb M., et al. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors // *Science.* — 1999. — Vol. 284. — P. 1998–2003.

Kamiya A., Kinoshita T., Ito Y., et al. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer // *EMBO J.* — 1999. — Vol. 18. — P. 2127–2136.

Kay A.M., Fausto N. Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies // *Mol. Med. Today.* — 1997. — Vol. 3, 3. — P. 108–115.

Kim T.H., Mars W.M., Stolz D.B., et al. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat // *Hepatology.* — 1997. — Vol. 26. — P. 896–904.

Kinoshita T., Miyajima A. Cytokine regulation of liver development // *Biochem. Biophys. Acta.* — 2002. — Vol. 1592. — P. 303–312.

Kinoshita T., Sekiguchi T., Xu M.J., et al. Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — Vol. 96. — P. 7265–7270.

Kovalovich K., Li W., DeAngelis R., et al. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2 and Bcl-xL // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 26605–26611.

Kubota H., Reid L.M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 12132–12137.

Lenzi R., Liu M., Tarsetti F., et al. Histogenesis of bile duct-like cells proliferating during ethionine hepatocarcinogenesis. Evidence for a biliary epithelial nature of oval cells // *Lab. Invest.* — 1992. — Vol. 66. — P. 390–402.

Marsden E.R., Hu Z., Fujio K., et al. Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation // *Lab. Invest.* — 1992. — Vol. 67. — P. 427–433.

Mead J.E., Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1989. — Vol. 86. — P. 1558–15625.

Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. Liver regeneration // *Science.* — 1997. — Vol. 276. — P. 60–66.

Ochenashko O.V., Volkova N.A., Mazur S.P., et al. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl4-induced cirrhosis // *Cell Transplant.* 2006. — Vol. 15, 1. — P. 23–33.

Oh S-H. Hepatic oval «stem» cell in liver regeneration // *Semin. Cell and Dev. Biol.* — 2002. — Vol. 13, 6. — P. 405–409.

- Overturf K., al-Dhalimy M., Ou C.N., et al.* Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes // *Am. J. Pathol.* — 1997. — Vol. 151. — P. 1273–1280.
- Overturf K., al-Dhalimy M., Ou C.N., et al.* Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I // *Nat. Genet.* — 1996. — Vol. 12. — P. 266–273.
- Paku S., Schnur J., Nagy P., et al.* Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver // *Am. J. Pathol.* — 2001. — Vol. 158. — P. 1313–1323.
- Petersen B.E., Goff J.P., Greenberger J.S., et al.* Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat // *Hepatology.* — 1998. — Vol. 27. — P. 433–445.
- Rhim J.A., Sandgren E.P., Degen J.L., et al.* Replacement of disease mouse liver by hepatic cell transplantation // *Science.* — 1994. — Vol. 263. — P. 1149–1152.
- Sandhu J. Petkov P.M., Dabeva M.D., et al.* Stem cell properties of and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells // *Am. J. Pathol.* — 2001. — Vol. 159. — P. 1323–1334.
- Sell S.* Liver stem cells // *Science.* — 1993. — Vol. 260. — P. 1224–1226.
- Sirica A.E., Mathis G.A., Sano N., et al.* Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells // *Pathobiology.* — 1990. — Vol. 58. — P. 44–64.
- Schmelzer E., Zhang L., Bruce A., et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors // *J. Exp. Med.* — 2007. — Vol. 204, 8. — P. 1973–1987.
- Song Z., Cai J., Liu Y., et al.* Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells // *Cell Res.* — 2009. — Vol. 19, 11. — P. 1233–1242.
- Takata A., Otsuka M., Kogiso T., et al.* Direct differentiation of hepatic cells from human induced pluripotent stem cells using a limited number of cytokines // *Hepatology. Int.* — 2011 (in press).
- Theise N.D.* Liver stem cells: prospects for treatment of inherited and acquired liver diseases // *Expert. Opin. Biol. Ther.* — 2003. — Vol. 3. — P. 403–408.
- Theise N.D., Saxena R., Portmann B.C., et al.* The canals of Hering and hepatic stem cells in humans // *Hepatology.* — 1999. — Vol. 30. — P. 1425–1433.
- Thorgeirsson S.S., Evarts R.P., Bisgaard H.C., et al.* Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1993. — Vol. 204. — P. 253–260.
- Thorgeirsson S.S., Grisham J.W.* Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence // *Hepatology.* — 2006. — Vol. 43, 1. — P. 2–8.
- Tetsuya Imamura, Li Cui, Ruifeng Teng, et al.* Embryonic Stem Cell-Derived Embryoid Bodies in Three-Dimensional Culture System Form Hepatocyte-Like Cells in Vitro and in Vivo // *Tissue Engineering.* — 2004. — Vol. 10, 11/12. — P. 1716–1724.
- Tsuchiya A., Heike T., Baba S., et al.* Long-term culture of postnatal mouse hepatic stem/progenitor cells and their relative developmental hierarchy // *Stem Cells.* — 2007. — Vol. 25, 4. — P. 895–902.
- Wang X., Foster M., Al-Dhalimy M., et al.* The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 11881–11888.
- Wells J.M., Melton D.* Vertebrate endoderm development // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 1999. — Vol. 15. — P. 393–410.
- Yin Y., Lim Y.K., Salto-Tellez M., et al.* AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo // *Stem Cells.* — 2002. — Vol. 20. — P. 338–346.
- Zajicek G.* Streaming liver. VIII: Cell production rates following partial hepatectomy // *Liver.* — 1991. — Vol. 11. — P. 347–358.
- Zaret K.S.* Molecular genetics of early liver development // *Annu. Rev. Physiol.* — 1996. — Vol. 58. — P. 231–251.
- Zarnegar R., Michalopoulos G.K.* The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis // *J. Cell Biol.* — 1995. — Vol. 129. — P. 1177–1180.
- Zhang Y., Bai X.F., Huang C.X.* Hepatic stem cells: existence and origin // *World J. Gastroenterol.* — 2003. — Vol. 9. — P. 201–204.
- Zheng A.Y., Kaneko S.* Clonal identification and characterization of pluripotent stem cells in the developing liver // *J. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 156, 1. — P. 173–184.

ГЛАВА 24. ПРЕТЕНДЕНТЫ НА СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ

24.1. Клеточный состав легких

Легкие представляют собой сложную трехпространственную структуру, состоящую из многочисленных, морфологически отличающихся эпителиальных клеток эндодермального происхождения. Клеточный состав эпителиальной выстилки легкого человека в разных отделах трахеобронхиального дерева неоднороден. В проксимальных воздушных путях (трахее и бронхах), снаружи покрытых хрящевыми пластинками, он представлен базальными, нейроэпителиальными, слизистыми, реснитчатыми и реснитчато-слизистыми клетками. Наиболее характерными для этого отдела легких являются относительно неспециализированные базальные клетки, экспрессирующие p63 и специфические цитокератины K14 и K5. Они формируют непрерывный слой на базальной мембране. Базальные клетки появляются в перинатальный период после дифференцировки слизистых и реснитчатых клеток. В проксимальных дыхательных путях также содержатся подслизистые железы, содержащие слизистые, серозные клетки и клетки железистых протоков. По этим путям воздух поступает в дистальные альвеолярно-капиллярные регионы и выходит обратно.

Эпителиальная выстилка более дистального региона, представленного мелкими бронхами и бронхиолами, имеет меньшую толщину и представлена двумя типами цилиндрических не секреторирующих слизь клеток — реснитчатыми клетками и клетками Клара. Последние, обычно расположенные на реснитчатых клетках, отличаются высоким уровнем метаболизма, секреторируют биологически активные вещества липопротеиновой природы.

Наиболее дистальный регион легких организован в сложную систему альвеол. Альвеолы выстланы двумя типами эпителиальных клеток — пневмоцитами I и II типа, которые образуют 95 % и 5 % альвеолярного покрытия, соответственно [Chen, et al., 2004]. Газовый обмен осуществляется через пневмоциты типа I, клетки с характерной уплощенной морфологией, образующие внутреннюю поверхность раздела между воздушным пространством альвеол и капиллярами легочной ткани. Пневмоциты типа II имеют кубовидную форму и содержат секреторные везикулы (ламеллярные тельца), заполненные сурфактантом. Клетки типа II секреторируют легочный сурфактант, сложную смесь белков и фосфолипидов, которая имеет более низкое поверхностное натяжение и предупреждает коллапс воздухоносных путей. Пневмоциты типа II также экспрессируют ряд ионтранспортирующих белков, необходимых для клиренса жидкости из легких [Matalon, O'Bradford, 1999]. Установлено, что кубовидные пневмоциты типа II обеспечивают защиту легких, способны в реакции на повреждение восполнить свою численность и вызвать образование конечных дифференцированных уплощенных пневмоцитов типа I [123, 484]. Таким образом, пневмоциты типа II имеют решающее значение для гомеостаза альвеол и восстановления легочной ткани после повреждения и являются, очевидно, СК альвеолярного эпителия [Otto, 1997; Rippon, et al., 2006]. Переходный район между конечными бронхиолами и альвеолами называют бронхоальвеолярным пространством или bronchioalveolar duct junction (BADJ).

Врожденная сложность, наряду с некоторыми уникальными особенностями легочной структуры и биологии, затрудняют изучение и идентификацию СК легких. Все еще больше осложняется методическими трудностями, связанными с выделением чистых популяций легочных клеток для работы *in vitro*. Несмотря на эти ограничения, несколько типов эндогенных клеток-предшественников были идентифицированы в проксимальных и дистальных регионах легких (рис. 24.1). Поскольку эпителиальные клетки в легких млекопитающих живут около 4 месяцев и в норме самовозобновляются очень медленно, для изучения их восстановления используют экспериментальные модели повреждения легких, основанные на действии токсичных веществ, таких как нафталин, окислители, двуокись серы и др. [Rawlins, et al., 2006]. Широко распространенная модель повреждения клеток Клара нафталином основана на том, что попадая в легкие с током крови этот ароматический углеводород повреждает только те клетки, которые экспрессируют изоформу 2F2 цитохрома P450, метаболизирующую нафталин с образованием

токсичного эпоксида. Через несколько часов после внутрибрюшинного введения практически все клетки Клара погибают, а находящиеся под ними реснитчатые клетки, пытаясь покрыть базальную мембрану для сохранения ее барьерных свойств, подвергаются чрезмерному распластыванию, что сопровождается дезорганизацией и потерей ресничек. Репарация эпителия легких начинается через 2–3 дня после повреждения нафталином и продолжается 2–4 недели до достижения состояния нормы.

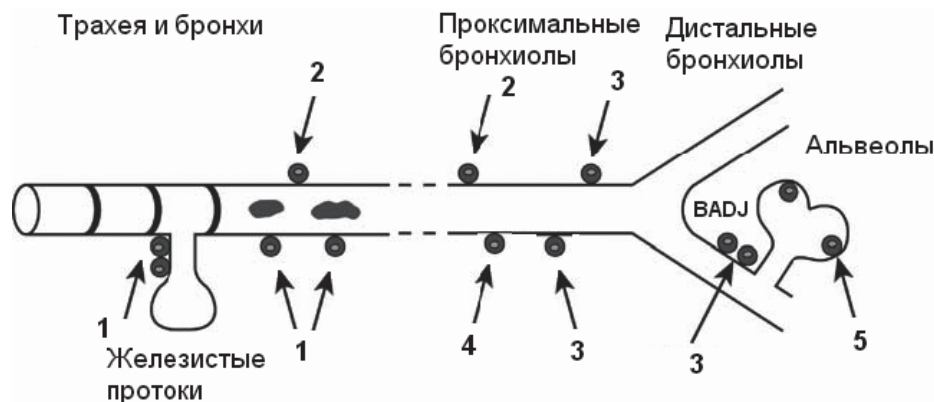


Рис. 24.1. Места локализации предполагаемых стволовых клеток в легких

В проксимальных воздушных путях на роль СК легких рассматривают базальные клетки (1) и нейроэндокринные клетки (2). Более проксимально, наряду с нейроэндокринными клетками (2) функции СК могут выполнять клетки Клара (3) и реснитчатые клетки (4). В альвеолах пневмоциты типа II (5) способны самообновляться и восполнять потерянные пневмоциты типа I.

После нафталинового повреждения первыми восстанавливают свое количество редко встречающиеся нейроэпителиальные клетки. Показано, что это восстановление происходит путем самообновления с участием Sonic Hedgehog (Shh) сигнальной системы [Reynolds, et al., 2000, Watkins, et al., 2003]. Однако восстановление клеток Клара и увеличение числа реснитчатых клеток происходит с участием различных механизмов в зависимости от регионов легких.

В проксимальных воздушных путях (трахее и бронхах) в качестве СК выступают базальные клетки. В пользу этого свидетельствуют данные, полученные путем прямого генетического мечения под контролем цитокератина K14 [Hong, et al., 2004]. В результате экспрессия цитокератина K14 была обнаружена в базальных клетках, клетках Клара и реснитчатых клетках. Эти данные позволяют полагать, что K14-позитивные базальные клетки способны самообновляться и образовывать клетки других линий, повреждающиеся при действии нафталина.

В дистальных отделах легких базальные клетки отсутствуют. В бронхах и бронхиолах на роль СК претендует небольшая популяция клеток Клара, устойчивая к токсическому действию нафталина, которая расположена, в основном, в нейроэпителиальных тельцах. Причем очевидно, что устойчивостью к нафталину обладают незрелые клетки с неразвитой системой цитохрома P-450. Вместе с тем клетки Клара, участвующие в репарации эпителия легких после нафталинового поражения, экспрессируют специфичные для них пептиды (кальцитонин-ген-родственный пептид и Scgblal), что не позволяет их рассматривать в качестве «классических» СК. Конкретный механизм восстановления клеточного состава эпителия, включающего оба типа цилиндрических клеток, за счет пролиферации клеток Клара до настоящего времени остается неизвестным, но их роль доказана экспериментами, в которых трансгенным мышам, экспрессирующим ген тимидинкиназы симплекс вируса герпеса, специфичного для этих клеток, обрабатывали ганицикловиром. В результате такой обработки погибали все без исключения клетки Клара и эпителий дыхательных путей не восстанавливался [Hong, et al., 2004, Reynolds, et al., 2000]. Способность клеток Клара не только самообновляться, но и образовывать реснитчатые клетки показана также

на моделях, индуцированных мощными окислителями, такими как озон или оксиды, селективно повреждающими реснитчатые клетки.

В то же время роль самих реснитчатых клеток в восстановлении эпителия легких в ответ на повреждение противоречива. В работе [Reynolds, et al., 2000] пролиферацию этих клеток в ответ на обработку нафталином не выявили, в то время как в более позднем исследовании [Park, et al., 2005] обнаружили не только их пролиферацию, но и способность трансдифференцироваться и давать рост клеткам других линий, т. е. проявлять свойства СК.

В альвеолах решающее значение для сохранения гомеостаза и восстановления легочной ткани после повреждения принадлежит, очевидно, пневмоцитам типа II [Rippon, et al., 2006, Otto, 1997]. Установлено, что в ответ на повреждение эти клетки способны восполнять собственную численность и образовывать конечные дифференцированные пневмоциты типа I [Brody, Williams, 1992, Mason, et al., 1997]. Таким образом, пневмоциты типа II являются наиболее реальными претендентами на роль СК альвеолярного эпителия.

Распределение претендентов на СК легких в воздушных путях очевидно неравномерно. Некоторые авторы отмечают большую частоту их локализации в подслизистых железах и бронхоальвеолярных пространствах (BADJ) [Borthwick, et al., 2001; Hong, et al., 2004].

Изучение эндогенных СК легких сопряжено с рядом трудностей, среди которых можно выделить и сложность органа, и слабую изученность поверхностных маркеров эпителиальных клеток. До настоящего времени идентификацию различных типов эпителиальных клеток, в основном, проводят на основании экспрессии секретированных белков, что ограничивает их выделение методом проточной цитометрии. Дополнительную проблему создают технические трудности, связанные с гистологическим изучением органа, содержащего газово-тканевую поверхность раздела. В связи с этим не исключено, что не все типы клеток легочного эпителия еще идентифицированы и среди неидентифицированных клеток могут быть выявлены новые претенденты на эндогенные СК легких.

24.2. Дифференцировка клеток костного мозга в клетки легких

Результаты ряда работ, проведенных на мышах, предполагают, что предшественниками дифференцированных клеток плотных органов могут быть СК КМ. В этих работах облученным животным трансплантировали клетки КМ, экспрессирующие легко выявляемые маркеры (GFP, Y-хромосома, LagZ, β-галактозидаза) [358, 402, 419; Kotton, et al., 2004]. Происходящие из КМ клетки паренхиматозных органов определяли по нахождению примененного маркера и селективных маркеров дифференцировки. На основании такого экспериментального подхода было заключено, что клетки костномозгового происхождения содействуют образованию многих типов эпителиальных клеток в различных органах, в том числе и в легких.

Авторы работы [402], которым принадлежит первая значительная работа по исследованию СК в легких, трансплантировали самкам мышей с подавленной функцией КМ единичную СК, происходящую из КМ самца, способную поддерживать гемопоэз донора. После трансплантации потомки этой СК характеризовались отсутствием линейных антигенов и способности к быстрому хоумингу в КМ. Они были обнаружены в легких в виде альвеолярных пневмоцитов типа II и эпителиальных клеток воздушных путей. Донорские клетки идентифицировали на основе наличия Y-хромосомы, цитокератина K14 и по экспрессии мРНК сурфактантного белка В, который в альвеолах специфичен для пневмоцитов типа II. К 11-му месяцу после трансплантации 20 % альвеолярных пневмоцитов, экспрессирующих цитокератин, демонстрировали наличие Y-хромосомы.

Последующие работы [Grove, et al., 2002; Theise, et al., 2002] с применением для трансплантации цельного КМ доноров или ГСК (CD34⁺/Lin⁻) подтвердили приживление в легких альвеолярных клеток типа II, которое определялось уже через 5 дней после трансплантации и было выраженным через 2 мес. Исследования [Grove, et al., 2002] показали, что трансдуцированные ретровирусом мультипотентные СК костномозгового происхождения могут образовывать цитокератин-позитивные эпителиальные клетки легких и пневмоциты обоих типов. В ядрах но-

вообразованных пневмоцитов типа II выявляли мРНК сурфактантного белка В, показывающую, что экспрессирующие трансген пневмоциты образовались в альвеолах мышей-реципиентов. Высокий уровень приживления эпителиальных клеток в легких реципиентов по сравнению с другими эпителиальными тканями, обнаруженный в этих работах, очевидно был обусловлен наличием в этом органе повреждающего фактора — воспаления, вызванного облучением, и присоединяющейся к нему вирусной инфекцией.

В дальнейшем выяснилось, что стромальные клетки КМ также способны образовать эпителиальные ткани легких. Авторы работы [Kotton, et al., 2001] вводили $1-2 \times 10^6$ адгезивных к пластике LagZ⁺ клеток КМ мышам, у которых не подавляли КМ. С 5-го и до 30 дня после введения клеток КМ у реципиентов выявляли небольшие кластеры прижившихся клеток с характерной уплощенной морфологией пневмоцитов типа I. Разросшиеся клетки экспрессировали T1 α — поверхностный маркер пневмоцитов типа I и связывали лектин *Lycopersicon esculentum*. После повреждения собственной альвеолярной ткани легких мышей антибиотиком блеомицином, вызывающим менее значительные повреждения, чем облучение, разрастание клеток было более выраженным. Вместе с тем, несмотря на тщательный анализ, образования пневмоцитов типа II не выявляли, даже в такой ранний срок, как 24 ч. после инъекции. К сожалению, в этой работе кроветворные CD45⁺ клетки не удалялись из вводимой популяции. В связи с этим утверждать, что именно стромальные клетки КМ приживлялись в описанных экспериментах, не представляется возможным.

В последующей работе [Ortiz, et al., 2003] это упущение было исправлено, и для введения были применены очищенные МСК КМ. В легких мышей, пораженных блеомицином, вновь обнаружили пневмоциты предположительно донорского происхождения. Эти клетки были выделены и подвергнуты анализу на наличие Y-хромосомы с применением ПЦР и гибридизации *in situ*. Оба метода анализа подтвердили наличие пневмоцитов, происходящих из МСК КМ донора-самца. Было показано, что единичные МСК КМ после введения в бластоцисты вызывали образование клеточных линий многих тканей, в том числе и легких [283].

МСК нектостомозового происхождения также обнаруживались в легких. Так, после введения животным МСК, меченных β -галактозидазой, они разрастались в легочной ткани в виде цитокератин⁺/CD45⁻ клеток, оседающих на стенках альвеол. При использовании в качестве маркеров GFP или LacZ экспрессия трансгенов после трансплантации сохранялась во всех типах клеток легочной ткани, тогда как Y-хромосома могла быть обнаружена только в тех случаях, если плоскость тканевого среза проходила через ядро [549; 551].

В небольшой клинической работе [Kleeberger, et al., 2003] был проведен анализ легочных клеток пациентов, которым трансплантировали легкие от несовместимых по полу доноров. В пересаженных легких 6–26 % эпителиальных клеток бронхов, 9–20 % пневмоцитов и 9–24 % клеток серознослизистых желез имели происхождение от реципиентов. При этом уровень приживления клеток реципиентов в донорских трансплантатах коррелировал со степенью хронического повреждения органа. Однако в этой работе не удалось доказать, что эпителиальные клетки в трансплантатах, генетически родственные реципиентам, имеют костномозговое происхождение.

Suratt и др. [Suratt et al., 2003] у двух из трех женщин-реципиентов, несовместимых по полу трансплантатов КМ, методом FISH анализа выявили химеризм 2,5–8 % клеток эпителия в биоптатах ткани легких. Авторы считают, что для приживления клеток костномозгового происхождения в виде эпителия необходимо хотя бы незначительное повреждение ткани. При отсутствии тканевого повреждения терапевтический потенциал клеток КМ, применяемых для лечения больных, был низким.

В последние годы стали учитывать, что появление новых маркированных и дифференцированных клеток может быть обусловлено не истинной пластичностью СК, а слиянием происходящих из КМ донорских клеток с клетками реципиента. Такое слияние было продемонстрировано в печени, сердце и мозге реципиентов [57, 409, 740]. Однако функциональный смысл слияния остается неясным, хотя оно может быть потенциальным механизмом восстановления

повреждения. С другой стороны, слияние не может опосредовать результаты приживления всех клеток [57; 549]. Поэтому в работах последнего времени особенно тщательно исследуются фенотипические особенности небольших популяций резидентных клеток внутри плотных органов. Исследователи пытаются выделить и охарактеризовать тканевые клетки в попытке обнаружить у них свойства СК. Один подход заключается в идентификации клеток, экспрессирующих такие антигены СК, как Sca-1 или c-kit [550; 589; Quaini, et al., 2002; 772]. Однако для легочной ткани такой подход ограничивается тем, что антиген Sca-1 экспрессируется также эндотелием артерий, вен и капилляров [Kotton, et al., 2003]. Другой подход основан на определении клеток боковой популяции (SP), которые могут быть выявлены при проточной цитометрии по исключению краски Hoechst. Клетки SP были обнаружены в различных плотных органах. В КМ SP клетки имеют фенотип $CD45^+/Sca-1^+$, $c-kit^+/Lin^-$. В легких взрослого человека такие клетки составляют 0,03 % общей суспензии клеток [Summer, et al., 2003]. Но в отличие от клеток SP КМ клетки легких подразделяются на 2 подтипа в зависимости от наличия или отсутствия маркера CD45. Оба подтипа легочных SP клеток являются $Sca-1^+$, Lin^- и экспрессируют Bcrp1 (Breast cancer resistance protein 1) [Summer, et al., 2003]. Хотя фенотип SP рассматривается в качестве надежного инструмента для идентификации СК, пока не проводилось работ по функциональному изучению этих клеток, которые бы подтвердили, что они действительно являются СК легких [Kotton, et al., 2004]. Различные возможные варианты происхождения эпителия легких из клеток КМ представлены на рис. 24.2.

Работы, демонстрирующие приживление клеток КМ в органах, часто становятся источником противоречий. Один из спорных вопросов касается способности различить иммуногистохимическими методами дифференцированные клетки от клеток, происходящих из КМ и оседающих внутри капилляров и тканевых промежутков [739; 771]. Этот вопрос имеет большое значение для легких из-за большого числа резидентных кроветворных клеток и интенсивной капиллярной сети. Следует полагать, что окончательно решить этот вопрос позволит применение трансгенных мышей, которые будут экспрессировать флуоресцентные маркеры под контролем промоторов, специфических для клеток легких.



Рис. 24.2. Возможные варианты происхождения эпителия легких из клеток КМ

Источником эпителиальных клеток легких в костном мозге могут быть ГСК, МСК, а также коммитированные легочные клетки-предшественники (ЛКП). После попадания в легкие приживление клеток может быть опосредовано тремя возможными механизмами: 1) попаданием клеток КМ в нишу клеток-предшественников легких; 2) слиянием клеток КМ с дифференцированными эпителиальными клетками легких; 3) прямой трансдифференцировкой клеток КМ в эпителиальные клетки легких. По данным Kotton, et al., 2004.

24.3. Перспективы применения стволовых клеток в терапии легочных заболеваний

В настоящее время на конечной стадии тяжелого легочного заболевания только трансплантация может дать больному надежду на продление жизни, однако недостаток донорских легких стимулирует поиск альтернативных источников. Такую альтернативу может предоставить регенеративная медицина, конечной целью которой является получение *ex vivo* здоровых клеток и тканей для трансплантации, в результате которой достигается восстановление функции органа *in vivo*.

Метод регенеративной медицины для лечения болезней легких неизбежно потребует образования альвеолярной ткани, являющейся основой газового обмена в легких. Пневмоциты типа II могут быть выделены из легочной ткани млекопитающих, в том числе человека. Однако выход этих клеток очень низкий, в процессе выделения они часто теряют свой фенотип и оказываются не в состоянии пролиферировать в условиях *in vitro* [Rippon, et al., 2006]. Кроме того, попытки создать легочную ткань методами клеточной инженерии, используя пневмоциты типа II, выделенные из легких доноров, вновь столкнутся с проблемой недостаточности запаса источника клеток. Пневмоциты типа II могут быть получены из ЭСК мыши и человека, причем выход может быть значительно повышен после кратковременной обработки ранних дифференцирующихся клеток высокой концентрацией активина А, лиганда, активирующего центральный (nodal) сигнальный путь [Kubo, et al., 2004]. Это, вероятно, одно из первых внушающих оптимизм сообщений о развитии тканевой инженерии для лечения заболеваний легких. Следует полагать, что имплантация пролиферирующих клеток-предшественников позволит снизить число клеток, необходимых для трансплантации, и приведет к более эффективной интеграции с тканями хозяина, чем имплантация постмитотических полностью дифференцированных клеток.

Другим направлением клеточной терапии легочных заболеваний может быть использование потенциала СК некоторых органов, которые могут не только восстанавливать ткань, из которой они произошли, но и поддерживать или заменять специфические СК других тканей после повреждения. Это касается прежде всего СК КМ, потенциал которых восстанавливать клетки легочной ткани после повреждения описан выше. Однако, к сожалению, до настоящего времени не получены доказательства того, что эпителиальные клетки легких, образованные из КМ, способны выполнять нормальные функции эпителия легких.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Asakura A., Seale P., Girgis-Gabardo A., Rudnicki M. A. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle // *J. Cell. Biol.* — 2002. — Vol. 159. — P. 123–134.

Borthwick D. W., Shahbazian M., Krantz Q. T., et al. Evidence for stemcell niches in the tracheal epithelium // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2001. — Vol. 24. — P. 662–670.

Brody J. S., Williams M. C. Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation // *Annu. Rev. Physiol.* — 1992. — Vol. 54. — P. 351–371.

Chen Z., Jin N., Narasaraaju T., et al. Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and II cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — Vol. 319. — P. 774–780.

Giangreco A., Reynolds S. D., Stripp B. R. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction // *Am J Pathol.* — 2002. — Vol. 161. — P. 173–182.

Grove J. E., Lutzko C., Priller J., et al. Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 27. — P. 645–651.

Hong, K. U., Reynolds, S. D., Watkins, S., et al. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am. J. Pathol.* — 2004. — Vol. 164. — P. 577–588.

Kleeberger W., Versmold A., Rothamel T., et al. Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury // *Am. J. Pathol.* — 2003. — Vol. 162. — P. 1487–1494.

- Kotton D.N., Ma B.Y., Cardoso W.V., et al.* Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium // *Development*. — 2001. — Vol. 128. — P. 5181–5188.
- Kotton D.N., Summer R., Fine A.* Lung stem cells: New paradigms // *Exp. Hematol.* — 2004. — Vol. 32. — P. 340–343.
- Kotton D.N., Summer R.S., Sun X., et al.* Stem cell antigen—1 expression in the pulmonary vascular endothelium // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* — 2003. — Vol. 284. — P. L990–L996.
- Kubo A., Shinozaki K., Shannon J.M., et al.* Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture // *Development*. — 2004. — Vol. 131. — P. 1651–1662.
- Mason R.J., Williams M.C., Moses H.L., et al.* Stem cells in lung development, disease and therapy // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 1997. — Vol. 16. — P. 355–363.
- Matalon S., O'Brodovich H.* Sodium channels in alveolar epithelial cells: Molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance // *Ann. Rev. Physiol.* — 1999. — Vol. 61. — P. 627–661.
- Ortiz L.A., Gambelli F., McBride C., et al.* Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 8407–8411.
- Otto W.R.* Lung stem cells // *Int. J. Exp. Pathol.* — 1997. — Vol. 78. — P. 291–310.
- Park K.S., Wells J.M., Zorn A.M., et al.* Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 34. — P. 151–157.
- Rawlins E.L., Hogan B.L.M.* Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? // *Development*. — 2006. — Vol. 133, P. 2455–2465.
- Reynolds S.D., Giangreco A., Power J.H., et al.* Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration // *Am J Pathol.* — 2000. — Vol. 156. — P. 269–278.
- Reynolds S.D., Homg K.U., Giangreco A., et al.* Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* — 2000. — Vol. 278. — P. 1256–1263.
- Rippon H.J., Polak L.M., Qin M., et al.* Derivation of distal lung epithelial progenitors from murine embryonic stem cells using a novel 3-step differentiation protocol // *Stem Cells Express.* — Alpha Med. Press, 2006. — P. 3–20.
- Summer R., Kotton D.N., Sun Xye, et al.* Side population cells and Bcrp1 expression in lung // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*. — 2003. — Vol. 285. — P. 97–104.
- Suratt B.T., Cool C.D., Serls A.E., et al.* Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2003. — Vol. 168. — P. 318–322.
- Theise N.D., Henegariu O., Grove J., et al.* Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bonemarrow // *Exp. Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 1333–1338.
- Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., et al.* Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. — 2003. — Vol. 422, 313–317.

ГЛАВА 25. ПОДЖЕЛУДОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД, диабет 1-го типа) развивается в результате повреждения инсулин-продуцирующих бета-клеток поджелудочной железы (ПЖ). Эффективного метода лечения этого заболевания до настоящего времени не существует, и количество пациентов с ИЗСД быстро возрастает во всем мире. Введение инсулина не воссоздает тот уровень регуляции гомеостаза глюкозы, которой обеспечивают β -клетки поджелудочной железы, в результате чего у больных развиваются осложнения. Замена поврежденных клеток путем трансплантации аллогенных островков поджелудочной железы приводит или к кратковременному эффекту в результате отторжения трансплантированных клеток, или к необходимости проведения длительной иммуносупрессивной терапии. Кроме того, такой подход ограничивается количеством доноров поджелудочной железы. В связи с этим поиск новых источников клеток для замещения поврежденных островков поджелудочной железы продолжается. При этом большие надежды возлагают на достижения регенеративной медицины, направленные на использование стволовых клеток.

25.1. Гистогенез поджелудочной железы

Во время эмбриогенеза эмбриональная энтодерма, принявшая форму примитивной кишечной трубки, служит матрицей для ЖКТ, из популяции клеток которого образуется ПЖ [314]. Два выпячивания по сторонам 12-перстной кишки, определяемые как дорзальная и вентральная почки, образуют первичную ПЖ. Эти зачатки железы, содержащие эндокринные и экзокринные тканевые компоненты, вначале растут независимо один от другого, а затем сливаются. В результате разветвленного морфогенеза панкреатической почки возникают протоки и ацинарные компоненты железы (рис. 25.1). Ацинусы ПЖ состоят из экзокринных клеток, предназначенных для секреции в кишечник пищеварительных ферментов. Эндокринные клетки-предшественники, развивающиеся из протоков ПЖ, образуют кластеры дифференцированных клеток, получивших название островки Лангерганса. Они состоят из 4-х клеточных популяций: α -клетки продуцируют глюкагон; β -клетки — инсулин; γ -клетки (PP-клетки) — панкреатический полипептид и δ -клетки — соматостатин [Trucco, 2005]. В ПЖ человека содержится около 1 млн островков, каждый из которых состоит примерно из 3000 клеток, 75 % которых являются β -клетками [49]. При нормальном эмбриональном развитии неогенез островков из эпителиальных клеток протоков происходит только в очень ранний период постнатальной жизни. Но уже в возрасте 2–3 недель островки ПЖ отличаются от структуры протоков и хорошо различимы. С этого времени эндокринные клетки в протоках больше не обнаруживаются [406].

В онтогенезе ПЖ для развития β -клеток необходимо координированное действие каскада факторов транскрипции [310; Hellerstrom & Swenne, 1991; Kim & Melton, 1998; Wang et al., 2004; Jiang et al., 2007]. Ngn3 определяет эндокринную судьбу клетки и индуцирует образование Pax4, который в комплексе с Nkx2, 2 и Nkx6, 1 вызывает быструю индукцию Pax6 и Isl1 (Isl-1). Программа дифференцировки β -клеток завершается после повышения экспрессии Pdx1, индукции HB9 и начала синтеза инсулина. Протеин гомеодомена Pdx1, который участвует в регуляции экспрессии гена инсулина, имеет основное значение в развитии эндокринных и экзокринных компонентов железы. У мышей с дефицитом гена *Pdx1* ПЖ не развивается [Jonsen et al., 1994; Madsen et al., 1997]. Важным регулятором транскрипции гена *Pdx1* является HNF3 β , который необходим для формирования фенотипа эндокринных клеток ПЖ [406; 838]. У взрослых все эти факторы транскрипции могут быть использованы в качестве маркеров предшественников β -клеток.

Помимо образования ПЖ из кишечной энтодермы в регионе 12-перстной кишки, гетеротопические образования ткани ПЖ, содержащие зрелые эндокринные клетки, могут также возникать

в других регионах ЖКТ [406]. Как показали исследования, проведенные на цыплятах, гетеротопическому образованию ткани ПЖ в регионах желудка и 12-перстной кишки благоприятствует подавление внутриклеточного сигнального белка Sonic hedge hog (Shh) [Kim, Melton, 1998].

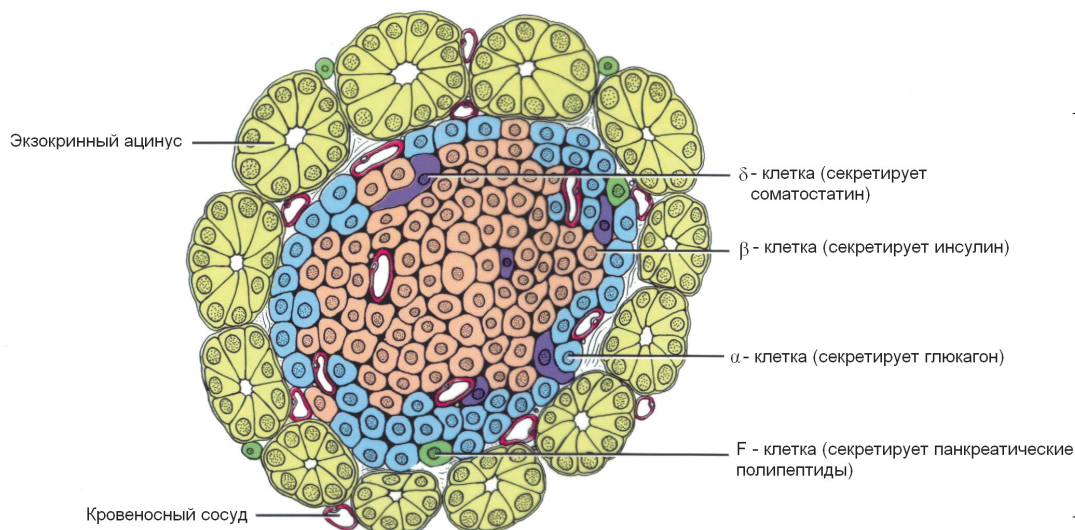


Рис. 25.1. Клеточный состав поджелудочной железы

ПЖ состоит из 2-х типов тканей. Ее основную массу составляет экзокринная ткань, образующая ацинарные клетки, секретирующие ферменты ПЖ, поступающие в кишечник. По всей экзокринной ткани рассеяны кластеры эндокринных клеток, известные как островки Лангерганса. Внутри островка α-клетки производят глюкагон, β-клетки – инсулин, δ-клетки и γ-клетки – соматостатин и панкреатический полипептид соответственно.

25.2. Регенерация островков поджелудочной железы

По некоторым данным [109], в островке взрослой крысы в течение дня образуется до 3 % новых β-клеток. Клетки, способные *in vitro* пройти начальные этапы дифференцировки в клетки с эндокринным фенотипом ПЖ, обнаруживались среди клеток протоков ПЖ человека и грызунов [Bonner-Weir, et al., 2000; Choi, et al., 2004; Ramiya, et al., 2000; Teitelman, 1996 Trucco, 2005], в экзокринной ткани железы [Lipsett, Finegood, 2002] и внутри островков [235, Teitelman, 1996, 848]. Но другие биологические особенности этих клеток остались не выясненными. Предполагают, что регенерация эндокринных клеток ПЖ может осуществляться разными способами, в которых используются как региональные внутритканевые клетки-предшественники, ожидающие *in situ* сигнала к дифференцировке, так и экзогенные циркулирующие прогениторные клетки [Kofman, et al., 2004]. Распространено также мнение, что все эндокринные клетки островков ПЖ образуются из дуктальных эпителиальных СК через ряд последовательных дифференцировок [Hellerstrom, Swenne, 1991].

У взрослых β-клетки ПЖ имеют очень низкий митотический индекс, в связи с чем в патологических состояниях, когда происходит разрушение островков, как, например, при ИЗСД, регенерация β-клеток не наблюдается [109]. После введения взрослым крысам стрептозотоцина, приводящего к разрушению островков и развитию диабета, регенерация островков также не выявляется [406]. Однако в некоторых условиях новые клетки островков ПЖ могут появиться как в раннем постнатальном периоде, так и во взрослой жизни. Например, в работах [Bonner-Weir et al., 2000; Ramiya et al., 2000] выявили ограниченную регенерацию островков у молодых крыс после

частичной панкреатэктомии. В этих случаях новые островки дифференцировались из эпителия протоков, повторяя образование островков в эмбриогенезе. Регенерацию клеток островков также наблюдали после перевязки артерий ПЖ, при стероидном диабете, после введения аллоксана или антител к инсулину, при обертывании ПЖ целлофаном и чрезмерной экспрессии IFN- γ [обзоры 406; Trucco, 2005]. Наиболее выраженная регенерация островков после их разрушения отмечается у новорожденных животных, но даже у них только очень небольшое число клеток внутри протоков ПЖ становится инсулинпозитивными.

Предполагают [406], что новые клетки островков ПЖ у млекопитающих после рождения образуются вследствие двух процессов: один процесс обеспечивается делением содержащихся в ткани островков дифференцированных β -клеток. Другой процесс является результатом развития СК, постоянно находящихся в протоках ПЖ. В последнем случае СК, не проявляющие активности у взрослых, в раннем постнатальном периоде и при наличии определенных условий могут «реактивироваться», образуя новые эндокринные клетки и островки. По всей вероятности, α - и β -клетки развиваются из общего Pdx1-позитивного предшественника, не проявляющего экспрессию гормонов, и в связи с этим предполагают, что остальные типы клеток, выявляемые в островке, могут происходить из общей эндокринной СК или клетки-предшественника [Trucco, 2005]. В литературе имеются сообщения о небольших круглых эпителиоидных клетках, появляющихся в культуре клеток протоков мышей NOD, из которых можно было получить все типы эндокринных клеток ПЖ [Ramiya et al., 2000].

В качестве возможных источников образования новых инсулинопродуцирующих β -клеток называются следующие (рис. 25.2): 1) деление предсуществующих β -клеток; 2) дифференцировка из других клеток островков и внутриостровковых СК; 3) трансдифференцировка из ацинарных клеток ПЖ; 4) неогенез из клеток эпителия протоков ПЖ [110].

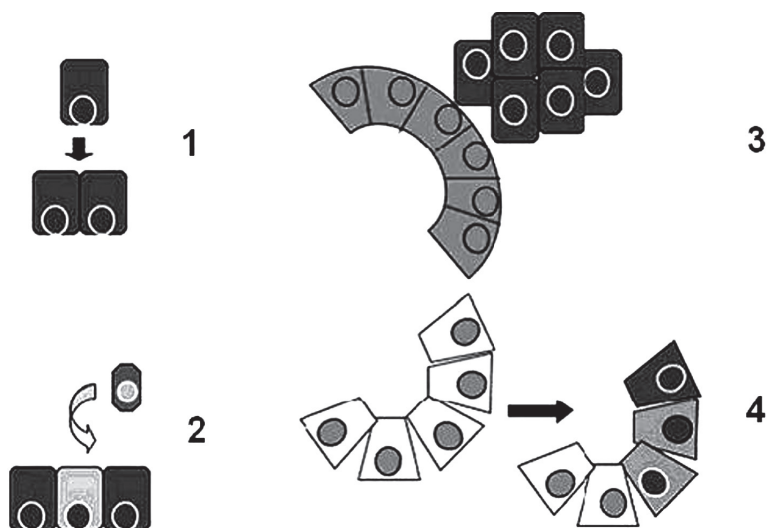


Рис. 25.2. Возможные источники образования новых инсулинпродуцирующих β -клеток в поджелудочной железе

- 1 — деление существующих β -клеток;
 - 2 — дифференцировка из других клеток островков и внутриостровковых стволовых клеток;
 - 3 — неогенез из клеток эпителия протоков поджелудочной железы;
 - 4 — трансдифференцировка из ацинарных клеток поджелудочной железы.
- По работе Bonner-Weir [109].

Авторы одной из работ [Lipsett, Finegood, 2002] считают, что основной вклад в образование новых клеток обеспечивает дифференцировка существующих предшественников β -клеток. Клетки развивающейся ПЖ экспрессируют нестин — известный маркер нейральных клеток.

Нестин-позитивные клетки, выделенные из взрослых островков, могут дифференцироваться в инсулинсекретирующие клетки, а выделенные из развивающейся железы — образуют при экспансии инсулинэкспрессирующие кластеры, подобные островкам Лангерганса, способные нормализовать гипергликемию у диабетичных мышей [Huang, Tang, 2003].

Повышение массы β -клеток может происходить вследствие увеличения репликаций, возрастания размеров и снижения гибели β -клеток, а также путем дифференцировки существующих предшественников β -клеток [Lipsett, Finegood, 2002]. Авторы работы [Seaberg et al., 2004] описали колонии, развивающиеся с одинаковой частотой (примерно 2 колонии / 10^4 клеток) как из протоков, так и островков ПЖ мыши, а также из нестин-позитивных и нестин-негативных фракций этих разновидностей клеток. Первичные клетки этих клонов были нестин⁺ / Pdx1⁺, но никогда ни эти первичные, ни культивированные клетки не экспрессировали такие маркеры плюрипотенции, как Oct-4 или Nanog, считающиеся специфическими для предшественников каждого типа эмбриональных клеток [49; Weir, Bonner-Weir, 2004]. Долговременная культура недифференцированных гормон-негативных нестин-позитивных клеток из островков и протоков ПЖ человека и крысы была получена Zulewski и др. [848]. При изменении условий культивирования эти клетки начинали экспрессировать Pdx1 и становились инсулин-позитивными. Использование в качестве маркера эндокринных клеток нестина, специфического маркера нейральных СК, справедливо критиковалось, так как нестин могут экспрессировать в строме ПЖ также фибробластоподобные клетки [110]. К тому же недавно было показано на трансгенных мышцах, что нестинэкспрессирующие клетки участвуют в развитии микрососудистой сети островков [Treutelaar, et al., 2003].

Для изучения ИЗСД было получено много трансгенных линий мышей, однако регенерацию клеток островков наблюдали у мышей только одной линии. В клетках ПЖ этих мышей выявляли экспрессию трансгена фактора некроза опухоли (TNF α) под контролем промотора инсулина [Higuchi, et al., 1992]. Экспрессия TNF α вызывала дезорганизацию структуры островков и пролиферацию протоков ПЖ; при этом отмечалась умеренная регенерация эндокринных клеток. Американские исследователи [Gu, et al., 1994; 397] разработали экспериментальную модельную систему, в которой регенерацию ПЖ и образование островков наблюдали в течение всей взрослой жизни животных. Мыши Ins-IFN γ , экспрессирующие IFN γ в β -клетках ПЖ, отличались необычайно высокой пролиферативной активностью в эпителиальных клетках протоков.

Авторы показали, что протоки ПЖ этих мышей являются источником новых эндокринных клеток и предположили, что в протоках содержится популяция пролиферирующих СК [Gu, et al., 1994]. Интерес представляет наблюдение о том, что в ПЖ этих мышей гиперплазия протоков выявляется одновременно с деструкцией островков инфильтрирующими лимфобластами. Новообразованные островки развивались в просвете протоков, в которых они были защищены от инфильтрации и деструкции. По мнению авторов, клетки протоков, экспрессирующие Pdx1 или Pdx1 и инсулин, являются теми эндокринными клетками-предшественниками, из которых образуются новые островки. Предполагают, что клетки, экспрессирующие Pdx1 без инсулина, являются более ранним типом клеток-предшественников.

Авторы работы [406] отметили большое сходство между образованием островков ПЖ во время онтогенеза и регенерацией ПЖ, опосредованной IFN γ . В обоих случаях новые эндокринные клетки происходили из клеток протоков, экспрессирующих более одного гормона и такие молекулы, как Pdx1 и Isl-1. По данным других авторов, клетки эпителия ПЖ, растущие под капсулой почки крысы (привилегированное в иммунологическом отношении место) образовывали чистые кластеры зрелых островков без каких-либо ацинарных или дуктальных компонентов [Gittes, et al., 1996]. Это наблюдение противоречит многим другим исследованиям, показывающим, что островки происходят из протоков. До появления уточняющих данных будет правильнее заключить, что могут быть, вероятно, альтернативные пути, приводящие к образованию зрелых островков.

Относительно недавно мультипотентные клетки-предшественники ПЖ были выделены из ткани ПЖ методом проточного сортирования с использованием в качестве маркера с-Met — рецептора HGF [715]. Авторы этой работы установили, что взаимодействие с-Met и HGF, в результате которого возникает сигнал обмена между эпителиальными и мезенхимальными клетками, имеет большое значение для развития ПЖ. Предположили, что взаимодействие с-Met-HGF ответственно за рост и дифференцировку СК и прогениторных клеток ПЖ не только во время развития этого органа в эмбриогенезе, но также у взрослых, у которых эти клетки поддерживают гомеостаз и способствуют регенерации инсулин-продуцирующих клеток. Колонии, полученные из единичных с-Met-позитивных клеток, выделенных из ткани ПЖ новорожденных и взрослых мышей, содержали клетки, экспрессирующие маркеры эндокринных, ацинарных и дуктальных клеточных линий. Таким образом, все эти исследования поддерживают заключение, что в ПЖ содержатся эндокринные клетки-предшественники. Они локализованы не только в протоках, но также в самих островках, так как показано [Seaberg, et al., 2004], что обе субпопуляции содержат колониеобразующие клетки-предшественники. Это заключение не опровергает гипотезу, что дуктальные клетки ПЖ могут трансдифференцироваться в β -клетки в ответ на повышенный метаболический запрос или тканевое повреждение [110]. С другой стороны, это заключение согласуется с данными Dog и др. [211], которые считают, что как в нормальной ПЖ взрослых, так и после панкреатэктомии β -клетки не могут развиваться из предшественников, не относящихся к β -клеткам.

Исследования, описанные в работе [211], проводились с применением антиэстрогена тамоксифена в системе Cre/lox, которую у трансгенных мышей можно индуцировать тамоксифеном. В этой системе происходит мечение всех полностью дифференцированных β -клеток, за которые принимались все постнатальные клетки, транскрибирующие ген инсулина и экспрессирующие белок ЦФ человека. Последний выявлялся гистохимическим методом. В ходе эксперимента только клетки, которые являются потомками предсуществующих и, следовательно, меченых β -клеток, метились заново. При этом новые β -клетки, происходящие из любого источника, не имеющего отношения к β -клеткам, включая СК, не метились. Предполагалось, что частота и распределение меченых β -клеток внутри островков ПЖ в конце анализа будут обратно пропорциональны числу новых немеченых клеток, выявленных в тех же структурах. Если частота меченых β -клеток не изменяется, что и наблюдалось, значит число клеток, происходящих от дифференцировки инсулиннепродуцирующих предшественников, должно быть минимальным или нулевым. На основании проведенных экспериментов пришли к заключению, что как в нормальной ПЖ взрослых, так и после панкреатэктомии β -клетки не могут развиваться из предшественников, не относящихся к β -клеткам. Невозможность авторов выявить клетки, дифференцирующиеся из СК или их предшественников, может быть обусловлена их очень малым количеством [Seaberg, et al., 2004] или блокированием тамоксифеном неогенеза эндокринных клеток из клеток-предшественников [Trucco, 2005]. В какой-то степени эта работа вступает в противоречие с многочисленными исследованиями, выполненными также на достаточно высоком уровне и свидетельствующими о существовании СК ПЖ.

Приведенные данные позволяют заключить, что предшественники эндокринных клеток островков существуют; они локализуются в самой эндокринной ткани или вблизи ее и могут активироваться повышенным метаболическим запросом или еще не полностью известными секреторными факторами. Физиологическое равновесие между погибшими и новообразованными клетками может быть изменено действием специфических для β -клеток аутореактивных Т-клеток, в присутствии которых развивается аутоиммунный процесс. Когда активность Т-клеток-киллеров преодолевает регенеративную компенсаторную активность ПЖ, число функционирующих β -клеток начинает прогрессивно снижаться до тех пор, пока их количество не станет слишком малым для сохранения гомеостаза глюкозы в организме.

25.3. Дифференцировка ЭСК в эндокринные клетки поджелудочной железы

Одними из первых о возможности дифференцировки ЭСК в инсулинсекретирующие клетки сообщили Soria и др. [702, 703] и Lumelsky и др. [467]. В работе последних авторов приводится подробный протокол получения клеток островков ПЖ из ЭСК. Позднее было сообщено о получении инсулинсекретирующих клеток из культивированных эмбрионидных теллец (ЭТ) [753]. Но ЭСК, дифференцированные *in vitro*, обычно дают начало разнообразным клеточным типам, и даже условия культивирования, ориентированные на дифференцировку в одном направлении, не позволяют получить очищенную популяцию клеток. Между тем развитие метода идентификации и селекции специфических типов клеток из смешанной популяции, возникающей в процессе дифференцировки ЭСК, совершенно необходимо для клеточной трансплантационной терапии. Подобную методику предложили Shiroy и др. [687]. Эти авторы из ЭСК, происходящих из линии E14tg2a и экспрессирующих ген устойчивости к бластицидину, получили диссоциированные клетки, которые культивировали в висячих каплях в течение 5 дней для образования ЭТ. Плотность клеток в одной капле была 500 клеток/20 мкл среды. ЭТ переносили в пластиковые чашки, обработанные желатиной, в которых эти образования прикреплялись; клетки их распластывались и активно пролиферировали. Через 5 дней после начала роста культур в них выявлялись различные типы клеток, включая сокращающиеся кардиомиоциты. Инсулинпродуцирующие клетки в разрастаниях ЭТ начинали обнаруживаться с 21 дня. Их идентифицировали по темно-красному окрашиванию, вызываемому дитизоном — цинк-хелирующим реактивом, избирательно окрашивающим β -клетки островков ПЖ из-за высокого содержания в них цинка [Clark, et al., 1994]. Интенсивность окраски была вначале слабой, но становилась отчетливой с 28-го дня, хотя содержание дитизон-позитивных клеток в это время было менее 0,1 % от общего числа клеток. После исследования чашки заполнялись средой, содержащей 10 % ФТС. Окрашивание полностью исчезало спустя 5 часов. Было установлено, что дитизон-позитивные клетки в кластерах являются иммунореактивными на инсулин и экспрессируют (PCR-RT) маркеры β -клеток островков ПЖ, включая гены панкреатико-дуоденального гомеобокса (*PDX1*) [Madsen, et al., 1997], а именно: проинсулина 1; проинсулина 2; глюкагона; панкреатического полипептида; транспортера глюкозы-2 (*Glut2*) и специфическую мРНК белка, родственного каталитической основе Г6Ф. Кластеры секретируют измеримое количество инсулина в среду культивирования.

Применение плюрипотентных ЭСК, способных к образованию большого количества клеток островков ПЖ, является альтернативой метода, связанного с получением очищенных островков из кадаверов, хорошо зарекомендовавшим себя в экспериментах и клинике. Но широкое применение трансплантации изолированных островков ограничено недостаточным количеством донорского материала и необходимостью проведения длительной иммуносупрессивной терапии. Мультипотентные ЭСК представляют в этом отношении неограниченный источник клеток. Важным этапом в успешном развитии терапии, основанной на применении дифференцированных производных ЭСК, является разработка метода специфической дифференцировки ЭСК, а также подбор средств, посредством которых необходимая линия клеток будет выделена из смешанной популяции и размножена. Островки ПЖ мыши, собаки, свиньи и человека, также как инсулинпродуцирующие клетки, окрашиваются дитизоном в темно-красный цвет. Это окрашивание дитизоном используется в качестве первого этапа при извлечении островков ПЖ из трупного материала. Окрашенные дитизоном кластеры содержат клетки, секретирующие инсулин [687]. Но такие клетки составляют только небольшой процент произвольно дифференцирующихся ЭСК. Для обогащения клетками островков может быть полезно сортирование клеток. Дифференцировку ЭСК в гормонопродуцирующие клетки ПЖ *in vivo* наблюдали Soria и др. [702, 703]. Новообразованные клетки островков корректировали развитие СД у мышей.

Приведенные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что плюрипотентные ЭСК могут рассматриваться в качестве источника получения большого или даже неограниченного количества клеток ПЖ для трансплантации. Однако рассчитывать на разработку методов лече-

ния ИЗСД, основанных на этом подходе, в ближайшее время не приходится. Помимо этических проблем, связанных с источником получения ЭСК, и возможной туморогенности этих клеток, необходимо еще разработать надежные методы направленной специфической дифференцировки ЭСК, выделения клеток нужного фенотипа из смешанной популяции и их экспансии. При этом нерешенными остаются вопросы о долговременной судьбе трансплантированных клеток и предотвращении их отторжения.

25.4. Дифференцировка клеток печени и эпителия кишечника в клетки поджелудочной железы

В связи с общностью происхождения из эмбриональной кишки предполагают, что клетки печени и кишечника, подобно клеткам ПЖ, могут трансдифференцироваться в инсулинпродуцирующие клетки [221, 590]. В то время как способность СК ПЖ превращаться в клетки печени была подтверждена, возможность дифференцировки СК печени в клетки ПЖ, особенно ее эндокринные клетки, долгое время оставалась невыясненной. В связи с этим значительный интерес вызвало сообщение об экспрессии гена инсулина в клетках печени [Efrat, 1998]. Автор предположил, что эта экспрессия обусловлена тем, что гепатоциты обладают некоторыми фенотипическими характеристиками β -клеток, включающими транспортер глюкозы GLUT-2 и глюкокиназу — фермента, фосфорилирующего глюкозу, который присутствует как в гепатоцитах, так и в клетках ПЖ) [221]. Печеночные клетки, таким образом, признавались клетками, способными в определенных условиях осуществлять эктопическое образование инсулина, которое могло регулироваться через экспрессию инсулина под контролем специфических для печени промоторов (например, фосфоэнолпируваткарбоксикиназы) [Efrat, 1998] или через повышенную экспрессию некоторых факторов транскрипции, существенных для функции β -клеток, таких как Pdx1 или NeuroD [Kojima, et al., 2003]. Эти работы намечают потенциальную возможность применения биопунктатов печени в качестве источника резервных СК для образования функциональных структур, подобных островкам, способных заменить утраченные при СД клетки.

Дифференцировку СК печени в клетки ПЖ *in vitro* описали Yang и др. [819]. По данным этих авторов, тщательно очищенные овальные клетки печени взрослых крыс, способные к дифференцировке в гепатоциты и эпителий желчных протоков (т.е., вероятно, СК печени), при культивировании в среде с высоким содержанием глюкозы превращались в клетки ПЖ, продуцирующие эндокринные гормоны. В процессе дифференцировки эти клетки образовывали трехпространственные структуры, напоминающие клетки островков, экспрессирующие транскрипты мРНК, имеющие отношение к дифференцировке (PDX-1, Pax-4, PAX-6, Nkx6.1, инсулин-1, инсулин-2, GLUT-2 и глюкагон), а также образовывали специфические для островков гормоны (инсулин, глюкагон, панкреатический полипептид). Одновременно эти клетки утрачивали экспрессию белка Нерраг гепатоцитов. Было установлено, что индукция дифференцировки зависит от двух условий: удаления из культуральной среды LIF, подавляющего дифференцировку, и постепенного повышения концентрации глюкозы, способствующей росту и дифференцировке β -клеток [Gittes, et al., 1996; Lipsett, Finegood, 2002]. При культивировании с глюкозой клетки синтезировали и секретировали инсулин, причем никотинамид стимулировал этот процесс. После трансплантации полученных образований под капсулу почки мышам NOD-SCID с модельным сахарным диабетом (СД) у животных выявляли восстановление нормального уровня глюкозы [819].

Репликативная способность клеток печени плода человека в зрелые гепатоциты, клетки желчных протоков и овальных клеток значительно повышалась как *in vitro*, так и *in vivo* после введения гена TERT (telomerase reverse transcriptase) без каких-либо проявлений неопластической трансформации клеток [Wege, et al., 2003]. В ходе данных исследований было показано, что обработанные клетки приобретали способность к ускоренному репрограммированию ядер *in vitro* под влиянием доминантных генов транскрипционных факторов, вводимых в эти клетки. Для клеток островков ПЖ мыши был детально описан целый каскад транскрипционных факторов, ответственных за развитие эндокринной ПЖ и специфическую генную экспрессию в диф-

ференцированных островках [Huang, Tsai, 2000, Kim, MacDonald, 2002, Servitja, et al., 2004]. Некоторые из этих транскрипционных факторов способны включить полную программу развития β -клеток. Клетки печени плода человека после эктопической экспрессии Pdx1 приобретали способность образовывать и сохранять зрелый инсулин в количестве до 1/3 количества гормона, образуемого нормальными β -клетками, освобождая его в реакции на физиологические уровни глюкозы и замещая функцию β -клеток у мышей NOD-Scid, обработанных стрептозотоцином [Zalzman, et al., 2003]. Приведенные работы свидетельствуют о принципиальной возможности получения эндокринных клеток ПЖ из СК печени. Однако гепатоциты не обладают регуляторным секреторным механизмом, создание которого для клеточной инженерии представит сложную задачу.

В отличие от клеток печени, эндокринные клетки в эпителии кишечника обладают регулируемым механизмом секреции, который позволяет им сохранять инсулин и освобождать его в ответ на физиологические сигналы [221]. В энтероцитах крыс линии IEC-6, проявляющих эктопическую экспрессию Pdx1, после обработки бетацеллуином — митогенным и дифференцировочным фактором β -клеток — или при коэкспрессии с Isl1, фактором транскрипции β -клеток, наблюдали активацию экспрессии инсулина [Kojima, et al., 2002]. Но субклеточный компонент, сохраняющий инсулин в этих клетках, не был определен. В другой работе, применяющей те же самые клетки и индукторы, наличие секреторных гранул инсулина было подтверждено электронной микроскопией [Yoshida, et al., 2002]. Наконец, в работе, проведенной на первичных клетках кишечника мыши, образование инсулина было индуцировано после обработки глюкагон-подобным пептидом 1, активирующим экспрессию Ngn3 — транскрипционного фактора, действующего в качестве регулятора развития эндокринной ПЖ [Suzuki, et al., 2003]. Трансплантация этих клеток мышам со стрептозотоциновым СД приводила спустя 8 недель к нормализации уровней глюкозы в крови. Эти работы предполагают, что клетки кишечника могут быть потенциальным источником клеток для получения суррогатных инсулинпродуцирующих линий. Однако эндокринные клетки в кишечнике очень редкие, и эпителий кишечника не легкодоступен для биопсии. Использование этого потенциала будет, вероятно, возможно только при применении аллогенных донорских клеток [221].

25.5. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в β -клетки поджелудочной железы

Тот факт, что мезенхимальные клетки развивающейся ПЖ в результате «мезенхимально-эпителиального перехода» дифференцируются в инсулинпродуцирующие клетки, позволяет предполагать, что МСК из других источников также обладают таким потенциалом. Действительно, МСК КМ мышей и крыс дифференцировались в эндокринные β -клетки ПЖ в культуре и были способны восстанавливать нормальный уровень глюкозы при трансплантации животным с моделью диабета [550, 725]. МСК КМ человека экспрессируют низкие уровни панкреатического транскрипционного фактора Nkx-6.1 и при аденовирусной трансдукции векторами, кодирующими транскрипционные факторы Irf-1, Nfix-9 или Foxa-2, могут дифференцироваться в инсулин-продуцирующие клетки [Moriscot, et al., 2005].

Ianus и др. [335] показали, что клетки КМ могут дифференцироваться в эндокринные β -клетки ПЖ без признаков слияния. Исследование проводили на дважды трансгенных мышях ROSA-stoplox-EGFP: C57BL/6, которые экспрессировали в геноме Cre рекомбиназу на промоторе инсулина (INS2-Cre). При повышении в клетках мышей активности промотора инсулина рекомбиназа Cre вырезает фланкирующие стоп-кодоны и обеспечивает посредством этого повышенную экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP). Таким образом, у этих мышей повышенное содержание GFP в клетках КМ могло проявиться только при условии транскрипции инсулина. После трансплантации КМ этих мышей облученным самкам мышей линии C57BL/6 флуоресцирующие клетки в островках ПЖ реципиентов обнаруживали в течение 1–2 месяцев. Эти клетки экспрессировали инсулин и другие генетические маркеры, типичные для β -клеток

островков (Glut2, IPF-1, HNF1 α , HNF1 β , HNF3 β , PAX6) и не экспрессировали гемопоэтический антиген CD45 и маркер ЭСК Oct-3/4. Так как в качестве доноров КМ использовали только самцов, флуоресцирующие клетки проявляли еще наличие Y-хромосомы.

В условиях *in vitro* клетки, происходящие из КМ самцов, секретируют инсулин при стимуляции глюкозой или эксендином-4 и показывали такие же колебания внутриклеточного уровня кальция, как β -клетки островков. Однако в опытах *in vivo* спустя 1–2 месяца после трансплантации клеток КМ самкам мышей C57BL/6 только 1–3 % клеток островков ПЖ реципиентов проявляли экспрессию GFP, т. е. обнаруживали свое происхождение из донорского КМ. Такая степень разрастания не соответствует продолжительности обновления эндокринных клеток в островках, которая в соответствии с данными работы [109] составляет около 30 дней.

Hess и др. [316] трансплантировали КМ трансгенных мышей, все клетки которых конститутивно экспрессировали GFP, облученным мышам со стрептозотоциновым диабетом. У мышей-реципиентов наблюдали развитие нормогликемии; уже спустя 17 дней у них выявляли нормальное образование инсулина и до 42-го дня отмечали повышенную степень выживаемости при сравнении с контрольными мышами (75–85 % против 0–50 %, соответственно). Увеличение содержания инсулина в сыворотке крови мышей коррелировало со снижением уровня глюкозы в крови. Было установлено, что снижение гликемии вызывалось трансплантацией c-kit-позитивных клеток КМ, тогда как c-kit-негативные клетки такого эффекта не вызывали. При сравнении приживления трансплантированных клеток КМ в печени и ПЖ обнаружили, что клетки разрастались лучше в ПЖ, пораженной стрептозотоцином.

Несмотря на, казалось бы, безупречную методику и достаточно убедительные данные, другие авторы [152] не смогли подтвердить дифференцировку клеток КМ в β -клетки ПЖ, выявленную в описанных выше работах [316; 335]. Эта противоречивость результатов может, возможно, объясняться тем, что клетки КМ доноров не прямо дифференцируются в эндокринные β -клетки ПЖ реципиентов, а через промежуточное звено, которым может быть образование из СК КМ новых кровеносных сосудов, клетки которых затем приобретают эндокринный фенотип [638]. По данным Hess и др. [316], происходящие из КМ клетки обнаруживались в двух регионах ПЖ: протоках и островках. Основная масса клеток в островках не содержала инсулин, хотя у реципиентов со стрептозотоциновым диабетом обнаруживалось некоторое число клеток, положительно окрашивающихся на инсулин. Однако эти клетки не экспрессировали специфический для β -клеток фактор транскрипции PDX-1. Авторы предположили, что инсулин-позитивные клетки не образуют гормон, а заимствуют его из окружающей среды. С помощью меченая бромдезоксипуридин (BrdU) у реципиентов КМ была выявлена повышенная пролиферация клеток, фактически отсутствующая у контрольных животных. На последующем этапе в ПЖ была отмечена дифференцировка происходящих из КМ клеток в эндотелиальные клетки, что установили по появлению положительного окрашивания клеток ПЖ на специфический белок эндотелия PECAM-1. Авторы заключили, что клетки КМ направляются в поврежденные островки, в которых они дифференцируются в эндотелиальные клетки. Эти клетки, в свою очередь, стимулируют пролиферацию прогениторных клеток хозяина, которые затем дифференцируются в эндокринные клетки ПЖ. Такой механизм эндокринной дифференцировки, стимулированной эндотелиальными клетками, прежде был описан в развивающейся ПЖ [Lammert, et al., 2001].

Украинские авторы [40; Schegelskaya et al., 2003] показали, что клетки стромы КМ мыши могут под действием ретиноевой кислоты дифференцироваться в β -клетки островков ПЖ, экспрессирующие инсулин. Культивирование проводили в кондиционной среде, полученной из культуры клеток эмбриональной ПЖ. Экспрессию инсулина в некоторых клетках островков выявляли на 5-е сутки после начала индукции иммуноцитохимическим методом и подтверждали определением специфической м-РНК.

МСК из КМ и жировой ткани характеризуются очень сходными фенотипом и дифференцировочным потенциалом [34, 846]. Следовательно, можно было предположить, что в жировой ткани существуют клетки, способные дифференцироваться в β -клетки ПЖ. Авторы ра-

боты [Timper, et al., 2006] выделили МСК из жировой ткани четырех доноров и размножили их в среде, содержащей FGF. После экспансии клетки экспрессировали нестин, SCF, Thy-1 и Isl-1. При дальнейшем культивировании в селективной безсывороточной дифференцирующей среде с высоким содержанием глюкозы, дополненной никотинамидом, активин-А, экспендином, пентагастрином и HGF, наблюдали повышение экспрессии транскрипционных факторов (Irf-1, Isl-1, Ngn-3) и генов инсулина, глюкагона и соматостатина. Параллельно в культуре обнаруживались клетки, экспрессирующие с-пептид. В наших исследованиях [Петренко и др., 2011] индукторами дифференцировки МСК жировой ткани в инсулинпродуцирующие клетки служили экстракты поджелудочной железы новорожденных поросят и экстракты регенерирующей ПЖ крыс. МСК, полученные из жировой ткани человека, с фенотипом CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD105⁺ и CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ при культивировании в среде с высоким содержанием глюкозы (25 mM) в присутствии 10 mM никотинамида образовывали кластеры, позитивно окрашивались на дитизон и экспрессировали инсулин и проинсулин. Присутствие в среде дифференцировки экстракта регенерирующей поджелудочной железы крыс или экстракта поджелудочной железы новорожденных поросят стимулировало направленную дифференцировку МСК в инсулинпродуцирующие клетки, причем эффективность индуцирующего действия экстракта поджелудочной железы новорожденных поросят была выше, что подтверждалось морфологически, позитивным окрашиванием дитизоном и иммуноцитохимическим анализом на инсулин и проинсулин.

Моноциты периферической крови также могут представлять альтернативный источник эндокринных клеток островков. Сообщали [638], что моноциты могут быть «перепрограммированы» *in vitro* при экспозиции с цитокинами (IL-3 и M-CSF). После дальнейшей экспозиции с EGF, HGF и никотинамидом может отмечаться дифференцировка прогениторных клеток моноцитарной линии в инсулинсодержащие клетки [Ruhnke, et al., 2005]. При трансплантации 2–3×10⁶ инсулинсекретирующих клеток под капсулу почки мышам со стрептозотоциновым диабетом выявляли коррекцию гипергликемии в течение 2-х дней.

25.6. Пластичность клеток поджелудочной железы

В некоторых условиях можно наблюдать трансдифференцировку клеток ПЖ в непанкреатические типы клеток, что позволяет говорить о пластичности клеток ПЖ [615, 617, 624]. У мышей db/db пролиферирующие клетки протоков вызывают иногда образование клеток мерцательного эпителия, слизистых клеток или секреторных клеток Панета. У человека описаны случаи метатпазии ПЖ, вызванной образованием высоко дифференцированных бокаловидных и других слизистых клеток из протоков железы [обзор 406]. У крыс, получающих рацион с недостатком меди, в ПЖ развивались клетки, похожие на гепатоциты, явно происходящие из дуктальных и интерстициальных клеток ПЖ [620]. Гепатоциты в ПЖ также обнаруживались при экспериментальной деструкции экзокринной ПЖ, после трансплантации эпителия ПЖ и у трансгенных мышей с чрезмерной экспрессией в ПЖ фактора роста кератиноцитов [обзоры 406, 677]. Эти наблюдения предполагают возможность наличия общей СК гепатоцитов и клеток ПЖ или потенциала пластичности между этими двумя конечными дифференцированными типами клеток [406].

Shen и др. [677] показали, что клетки ПЖ линии AR42J-B13 и органных культур зачатка ПЖ эмбриона мыши могут быть превращены в гепатоциты после обработки синтетическим глюкокортикоидом, дексаметазоном и активацией дифференцированных продуктов печени. Такую же трансдифференцировку можно было вызвать трансфекцией клеток с/EBPβ; напротив, доминантно-негативная форма с/EBPβ ингибировала этот процесс. Авторы заключили, что с/EBPβ является основным компонентом, различающим программы дифференцировки печени и ПЖ. Предполагают, что дексаметазон активирует рецепторы глюкокортикоидов. Это вызывает активацию транскрипции с/EBPβ, который усиливает синтез жирных кислот и повышает содержание комплекса жирные кислоты-CoA — известного лиганда HNF4α, регулирующего дифференцировку печени во время развития и регенерации [Nagy, et al., 1994;

Li, et al., 2000]. Комплекс жирные кислоты-CoA связывает HNF4 α , вызывая миграцию в ядро и активирование генов α -фетопротеина, транстиретина, ГбФ и других маркеров ранней дифференцировки печени [677].

Интересно отметить, что рядом авторов обнаружено наличие в островках ПЖ клеток, которые могут дифференцироваться по нейрональному типу [Choi, et al., 2004; Seaberg, et al., 2004]. Поэтому не исключается, что в ткани ПЖ млекопитающих содержатся нейрогенные или высокопотентные СК [37].

25.7. Клеточная терапия сахарного диабета в эксперименте и клинике

Сахарный диабет (СД) — одно из самых распространенных заболеваний, имеющее тенденцию к росту во всех странах мира. В Украине в 2004 году СД был зарегистрирован у 969 269 больных, или 2 043,1 человек на 100 тысяч населения. В 2006 году индекс заболеваемости СД в Украине увеличился до 2 242,6 человек на 100 тысяч населения, а лица, у которых СД был выявлен впервые, составили группу в 1 06 655 человек [8].

При СД 1 типа β -клетки разрушаются иммунной системой больного [Roche, et al., 2003]. Хотя диагностируют иногда редкие формы СД типа 1 идиопатического происхождения, в большинстве случаев это аутоиммунное заболевание. Описано образование антител к белкам, локализующимся на поверхности β -клеток островков (противоостровковые антитела), и против внутриклеточных белков (глутаматдекарбоксилазы и тирозинфосфатазы) [Mathis, et al., 2001]. Болезнь поражает главным образом, но не исключительно, детей и молодых лиц.

К СД типа 2 относятся нарушения углеводного обмена, сопровождающиеся выраженной или умеренной инсулинрезистентностью с дефектом секреции инсулина. В патогенезе этих нарушений имеют значение факторы окружающей среды и генетическая предрасположенность организма [Bell, Polonsky, 2001; 657]. Последние данные показывают, что 5–15 % взрослых с первично диагностированным СД типа 2 в течение долгого времени болели менее тяжелой и медленно прогрессирующей формой СД типа 1, называемой скрытым аутоиммунным диабетом [Zimmet, et al., 2001]. Основное событие в развитии СД типа 2 — дисфункция β -клеток островков. Эта дисфункция связана с избытком циркулирующих питательных веществ (главным образом, глюкозы и жирных кислот), которые влияют на функцию β -клеток, нарушая секрецию инсулина и профиль экспрессии генов (глюколипотоксичность) [Roche, 2003]. Эта форма СД поражает, главным образом, население индустриальных стран с 10 %-ным распространением среди последнего, но предполагают, что к 20-м годам текущего столетия этот уровень может удвоиться [638].

В настоящее время нет эффективного метода лечения СД. Введение инсулина не воссоздает той регуляции, с которой β -клетки контролируют гомеостаз глюкозы, в связи с чем у больных развиваются осложнения. В прошлом для лечения СД часто применялась трансплантация островков Лангерганса, но этот метод имел ограниченное применение из-за сложности получения донорской панкреатической ткани и иммунного отторжения трансплантата. Для эффективного замещения погибших клеток островков необходимы новые источники клеток, и такую возможность предоставляют клеточные препараты, содержащие мультипотентные клетки, способные к дифференцировке в эндокринные клетки островков ПЖ.

Среди источников мультипотентных клеток многие авторы долго отдавали предпочтение панкреатическим клеткам взрослых, из которых можно получить инсулинпродуцирующие клетки как *in vitro*, так и *in vivo* [Burke, et al., 2007; D'Alessandro, et al., 2007]. Однако и это направление регенеративной медицины было лимитировано возможностями размножения и направленной дифференцировки СК ПЖ [17]. В эксперименте на крысах предпринимались попытки индукции аутологичных овальных клеток печени в эндокринные β -клетки для лечения СД типа 1. Поскольку было установлено, что ведущими транскрипционными факторами в развитии и дифференцировке панкреатических островков являются панкреатические и дуоденальные гомеобоксодержащие гены *Pdx-1*, предположили, что трансфекция аденовирусной конструкции с этими генами в клетки печени индуцирует последние к дифференцировке в инсулин-продуцирующие клетки.

Действительно, в печени подопытных крыс были обнаружены инсулин-позитивные клетки, которые морфологически напоминали овальные клетки и давали позитивную реакцию на их маркеры — Thy-1 и цитокератин-19. У пролеченных этими клетками крыс снижался уровень гипергликемии, нормализовались вес тела и уровень липидов крови [Bonner-Weir, et al., 2008].

Ряд работ посвящен применению в эксперименте и клинике клеток печени плода человека. По данным Ю. В. Гладких [8], эти препараты «не только положительно влияют на углеводный обмен, но также изменяют иммунологический статус, увеличивая общее количество лимфоцитов, повышая содержание Т-лимфоцитов и изменяя соотношение субпопуляций лимфоцитов». У больных диабетической ретинопатией после введения криоконсервированных клеток плодовой печени объективная картина изменялась в течение 2–3 суток. Во всех случаях наблюдали рассасывание свежего гемофтальма без выраженных пролиферативных изменений в стекловидном теле или кровоизлияний (преретинальных и ретинальных). Все пациенты отмечали улучшение зрительных функций. У них нормализовались иммунологические показатели крови, отмечалась стабилизация показателей глюкозы крови [Демин, Петренко, 2001].

Альтернативными источниками получения клеточных препаратов для лечения СД являются пуповинная кровь и плацента. По данным Haller с соавторами, у детей, которым вводили клетки их собственной пуповинной крови, сохраненной в криобанке, все исследуемые показатели (глюкозотолерантный тест, уровни гликированной фракции гемоглобина в крови, С-пептида и необходимого количества инсулина в ЕД на кг в сутки, а также количество функционально активных Т-лимфоцитов) были лучше, чем у контролей [Haller, et al., 2008].

Другой распространенной идеей в клеточной терапии СД на современном этапе являются целенаправленные попытки остановить разрушение бета-клеток иммунной системой. Один подход к преодолению иммунных реакций разработали авторы работы [Verda, et al., 2008], предложившие получать ГСК из ЭСК. Такая линия СК, в отличие от ГСК, выделенных из КМ или периферической крови, не содержит лимфоцитов и антиген-представляющих клеток. Авторы показали, что ГСК, полученные из ЭСК, индуцируют толерантность к клеткам островков ПЖ — феномен, получивший название «трансплантат против аутоиммунитета» — без тех обычных осложнений, которые сопровождают трансплантацию аллогенных ГСК, в частности, без реакции «трансплантат против хозяина». ЭСК культивировались *in vitro*, индукционно дифференцировались в ГСК, селекционировались по экспрессии *c-kit* и вводились мышам NOD с СД внутривенно или в КМ после сублетального облучения. У 9-ти из 10-ти мышей после внутрикостномозговой трансплантации и у 5-ти из 8-ми животных группы внутривенного введения развилась нормогликемия. Спленоциты таких мышей были ареактивными по отношению к изоформе 65 глутаматдекарбоксилазы (диабетспецифический антиген), но нормально реагировали на иные антигены.

Авторы работы [Voltarelli, et al., 2007] исследовали влияние на течение впервые диагностированного СД типа 1 высокодозовой иммуносупрессии и аутологичной немиелоаблятивной трансплантации ГСК. У больных проводили мобилизацию ГСК обработкой циклофосфамидом и G-CSF. Затем эти клетки выделялись из периферической крови и криоконсервировались. Перед тем как клетки подвергнуть аутологичной трансплантации, они обрабатывались циклофосфамидом и антитимоцитарным глобулином. 14 из 15 больных стали инсулин-независимыми в среднем на протяжении 18,8 месяцев. Уровень в крови антител против глутаматдекарбоксилазы снижался через 6 месяцев и оставался стабильным через 12 и 24 месяца.

Trivedi и соавторы [Trivedi, et al., 2008] для лечения СД использовали трансплантацию ГСК в комбинации с мезенхимальными МК, выделенными из жировой ткани. У всех пациентов трансплантация прошла успешно и без осложнений. Уровень экзогенного инсулина снизился на 30–50 %, содержание в плазме крови С-пептида возрастало в 4–26 раз, что в среднем продолжалось 2,9 месяца.

Несколько коллективов исследователей изучали возможность лечения диабетичных мышей NOD — модели ИЗСД человека — методом трансплантации клеток КМ с целью развития химеризма. У преддиабетичных мышей NOD микрохимеризм предупреждал развитие аутоиммун-

ного СД. У диабетичных мышей NOD, у которых индукция микрохимеризма была нарушена сублетальным или летальным облучением, проводили трансплантацию КМ. Некоторым из животных для сохранения нормогликемии трансплантировали аллогенные островки ПЖ под капсулу одной из почек и проводили терапию экзогенным инсулином. Спустя 14 дней после окончания лечения инсулином и/или удаления почки (вместе с трансплантатом КМ) реципиентные мыши оставались нормогликемичными (т.е. были излечены) [Zorina, et al., 2003]. При анализе тканей ПЖ реципиентных мышей с использованием BrdU в них была отмечена повышенная пролиферативная активность и регенерация β -клеток. Аналогичную пролиферацию β -клеток обнаружили в островковой ткани, которую трансплантировали под капсулу почки, а затем удалили. Авторы заключили, что трансплантация КМ обеспечивает возможность пролиферации β -клеток или их предшественников в виде адаптивной реакции.

Другие авторы [395; Ryu, et al., 2001] сообщили, что инъекция мезенхимальных спленоцитов и полного адьюванта Фрейнда диабетичным мышам NOD подавляла проявления аутоиммунитета и восстанавливала нормогликемию. У этих животных вновь появлялись островки в ПЖ, секретирующие инсулин. Диабетичным самкам NOD, обработанным полным адьювантом Фрейнда, вводили под капсулу одной из почек трансплантат живых или облученных спленоцитов здоровых сингенных самцов. Спустя 40 дней 6 из 9 мышей, получивших инъекцию живых спленоцитов, после удаления почки с трансплантатом сохраняли нормогликемию. Этого не наблюдали ни у одного животного, получившего трансплантат облученных спленоцитов.

Kofman и др. [Kofman, et al., 2004] преддиабетичных самок NOD подвергали четырехкратному введению в течение 2-х недель CD45⁺, CD45⁻ или нефракционированные спленоциты, экспрессирующие GFP. У животных всех подгрупп сохранялась нормогликемия. Однако у реципиентов CD45⁻ или нефракционированных спленоцитов обнаруживались островки ПЖ с экспрессией GFP, а у самок, обработанных CD45⁺ спленоцитами, экспрессия GFP в клетках островков не наблюдалась. У этих животных выявили периаулит. Таким образом, кажется, что, хотя CD45⁺ спленоциты могут влиять на активность СД, в их составе нет клеток, способных прямо участвовать в регенерации островков. Остается неясным, каким образом развившийся аулит влияет на неидентифицированные эндогенные клетки-предшественники, восстанавливающие структуру островков.

Многие экспериментальные работы по клеточной терапии СД характеризуются временными положительными эффектами и полной неопределенностью в отношении дальнейшей судьбы инсулин-производящих клеток. Следует полагать, что в ближайшее время собственные клетки больных, выращенные из своих же клеточных резервов, должны стать одним из самых доступных и надежных методов лечения ИЗСД.

В заключение следует отметить, что образование новых β -клеток ПЖ для использования в качестве терапевтического средства станет возможным только после расшифровки процессов регуляции дифференцировки β -клеток под воздействием генетических и эпигенетических факторов. У новорожденных млекопитающих β -клетки образуются из нескольких источников, но точно идентифицировать клетки, способные приобрести фенотип β -клеток, в большинстве случаев не удастся. Условия культивирования, используемые при изучении репликации β -клеток *in vitro*, не соответствуют пока условиям *in vivo*, в результате чего *ex vivo* не удастся даже удвоить число β -клеток [221]. При, казалось бы, самом оптимальном применении ростовых факторов и матрикса, поддерживающих экспрессию регуляторных генов, наблюдают потерю фенотипа β -клеток [Beattie, et al., 1999; Zimmet, et al., 2001]. Тем не менее, работы, изучающие рост первичных β -клеток в культуре, могут в конечном итоге привести к выяснению необходимых условий экспансии и дифференцировки этих клеток. Другим важным направлением исследований является изучение потенциала неостровковой ткани ПЖ к образованию *in vitro* островков. Эффективность такой дифференцировки, наблюдаемая в настоящее время *in vitro*, недостаточна, чтобы отметить превращение этого процесса в полезный для клинического использования, но выявляемое в самое последнее время повышение неогенеза островков под влиянием сигнальных молекул, стимулирующих рост и дифференцировку, по-

звolyет предположить, что у человека неогенез может иметь более важную роль в увеличении массы β -клеток, чем репликация [221].

Кроме того, любые способы клеточной терапии ИЗСД, направленные на увеличение количества β -клеток, останутся малоэффективными до тех пор, пока не будут найдены способы подавления аутоиммунной реакции против β -клеток. А.В. Тимофеев в своем обзоре [Тимофеев А.В., 2009] приводит информацию о том, что уже в настоящее время проводятся клинические испытания препаратов, подавляющих образование или функции аутореактивных В- и Т-лимфоцитов у больных ИЗСД, либо индуцирующих толерантность к антигенам β -клеток. В заключение автор отмечает, что клеточные технологии могут использоваться в лечении не только ИЗСД, но и других типов и вариантов сахарного диабета, обусловленных разрушением или генетическими дефектами, что любые способы клеточной терапии ИЗСД, направленные на увеличение количества β -клеток, останутся малоэффективными до тех пор, пока не будут найдены способы подавления аутоиммунной реакции против β -клеток. А.В. Тимофеев в своем обзоре [Тимофеев А.В., 2009] приводит информацию о том, что уже в настоящее время проводятся клинические испытания препаратов, подавляющих образование или функции аутореактивных В- и Т-лимфоцитов у больных ИЗСД, либо индуцирующих толерантность к антигенам β -клеток.

Таким образом, для успешного развития новых методов лечения ИЗСД необходимо стимулировать изучение как процессов репликации β -клеток *in vitro*, так и неогенеза новой ткани островков. Успехи в этой работе позволят в будущем либо стимулировать *in vivo* эндогенную ПЖ, либо применять полученные *in vitro* новообразованные β -клетки для трансплантации больным.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Демин Ю.А., Петренко А.Ю. Лечение сосудистой патологии органов зрения трансплантацией криоконсервированных клеток эмбриональной печени // Медицинский международный журнал. — 2001. — 2. — С. 94–96.

Петренко Ю.А., Мазур С.П., Гришук В.П. и др. Выбор условий индукции дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в инсулинпродуцирующие клетки *in vitro* // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2011. — Т. 6, 1. — С. 1–7.

Тимофеев А.В. Клеточно-популяционная организация поджелудочной железы и применение клеточных технологий в лечении сахарного диабета // Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 2 / Под ред. М.А.Пальцева. — Москва: ОАО «Издательство Медицина». — 2009. — С. 253–310.

Beattie G. M., Itkin-Ansari P., Cirulli V., et al. Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets // Diabetes. — 1999. — Vol. 48. — P. 1013–1019.

Bell G. I., Polonsky K. S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function // Nature. — 2001. — Vol. 414. — P. 788–791.

Bonner-Weir S., Taneja M., Weir G. C., et al. In vitro cultivation of human islet from expanded ductal tissue // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 7999–8004.

Bonner-Weir S., Aye T., Inada A., et al. Generation of islets from pancreatic progenitor cells // in: Stem Cell and Gene-Based Therapy/ Eds A. Battler & J. Leor / Springer. — 2006. — P. 309–320.

Bonner-Weir S., Inada A., Yatoh S., et al. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells // Biochem. Society Transactions. — 2008. — Vol. 35, 3. — P. 1–6.

Burke Z. D., Thowfeequ S., Peran M., et al. Stem cells in the adult pancreas and liver // Biochem. J. — 2007. — Vol. 404, 2. — P. 71–78.

Choi Y., Ta M., Atouf F., et al. Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny // Stem cells. — 2004. — Vol. 22, 6. — P. 1070–1084.

Clark S. A., Borland K. M., Sherman S. D., et al. Staining and in vitro toxicity of dithizone with canine, porcine, and bovine islets // Cell Transplant. — 1994. — Vol. 3, 4. — P. 299–306.

D'Alessandro J.S., Lu K., Fung B.P., et al. Rapid and efficient in vitro generation of pancreatic islet progenitor cells from nonendocrine epithelial cells in the adult human pancreas // *Stem cells and development*. — 2007. — Vol. 16, 1. — P. 71–89.

Efrat S. Prospects for gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus // *Diabetologia*. — 1998. — Vol. 41. — P. 1401–1409.

Gittes G.K., Galante P.E., Hanahan D., et al. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: Role of mesenchymal factors // *Development*. — 1996. — Vol. 122. — P. 439–447.

Gu D., Lee M.S., Krah T., et al. Transitional cells in the regenerating pancreas // *Development*. — 1994. — Vol. 120. — P. 1873–1881.

Haller M.L., Viener Y.L., Wasserfall C., et al. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes // *Exp. Hematol.* — 2008. — Vol. 36, 6. — P. 1–5.

Hellerstrom C., Swenne I. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells // *Diabetes*. — 1991. — Vol. 40, 2. — P. 89–92.

Higuchi Y., Herrera P., Muniesa P., et al. Expression of a tumor necrosis factor in murine pancreatic cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes // *J. Exp. Med.* — 1992. — Vol. 176. — P. 1719–1731.

Huang H.P., Tsai M.J. Transcription factors involved in pancreatic islet development // *J. Biomed. Sci.* — 2000. — Vol. 7. — P. 27–34.

Huang H., Tang X. Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas // *Lab. Invest.* — 2003. — Vol. 83, 4. — P. 539–547.

Hussain M.A., Theise T.B. Stem-cell therapy for diabetes mellitus // *Lancet*. — 2004. — Vol. 364. — P. 204–205.

Jiang J., Au M., Lu K., et al. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells // *Stem cells (Dayton, Ohio)*. — 2007. — Vol. 25, 8. — P. 48–53.

Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., et al. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice // *Nature*. — 1994. — Vol. 371. — P. 606–609.

Kim S.K., MacDonald R.J. Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2002. — Vol. 12. — P. 540–547.

Kim S.K., Melton D.A. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95. — P. 1303–1309.

Kofman A., Theise N.D., Hussain M.A. Paradigms of adult stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus in mice // *Eur. J. Endocrinol.* — 2004. — Vol. 150. — P. 415–419.

Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., et al. NeuroD-beta-cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 596–603.

Lammert E., Cleaver O., Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels // *Science*. — 2001. — Vol. 294. — P. 564–567.

Li L., Ning G., Duncan S.A. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF4a. // *Genes Dev.* — 2000. — Vol. 14. — P. 464–474.

Lipsett M., Finegood D. Beta cells neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats // *Diabetes*. — 2002. — Vol. 51. — P. 1834–1841.

Lukowiak B., Vandewalle B., Riachy R., et al. Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc-fluorescent probe // *J. Histochem. Cytochem.* — 2001. — Vol. 49, 4. — P. 519–528.

Madsen O.D., Jensen J., Petersen H.V., et al. Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype // *Horm. Metab. Res.* — 1997. — Vol. 29. — P. 265–270.

Mathis D., Vence L., Benoist C. β -cell death during progression to diabetes // *Nature*. — 2001. — Vol. 414. — P. 792–798.

Moriscot C., de Fraipont F., Richard M.J. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro // *Stem Cells*. — 2005. — Vol. 23, 4. — P. 594–603.

- Nagy P., Bisgaard H. C., Thorgerirsson S. S. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation // J. Cell Biol. — 1994. — Vol. 126. — P. 223–233.
- Ramiya V.K., Maraist M., Arfors K.E., et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells // Nat. Med. — 2000. — Vol. 6. — P. 278–282.
- Roche E. Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and pancreatic B-cell dysfunction // Arch. Pharmaceutica. — 2003. — Vol. 44. — P. 313–332.
- Ruhnke M., Ungefroren H., Nussler A., et al. Differentiation of in-vitro modified human peripheral monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells // Gastroenterology. — 2005. — Vol. 128. — P. 174–178.
- Ryu S., Kodama S., Ryu K., et al. Reversal of established autoimmune diabetes by restoration of endogenous beta cell function // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 108. — P. 63–65.
- Schegelskaya E.A., Mikulinskii Y.E., Revishchin A. V. et al. Differentiation of stem cells in the culture // XII Intern. Congress on «Genes, Gene Families and Isozymes» Berlin, 2003. — P. 69–72.
- Seaberg R.M., Smukler S.R., Kieffer T.J., et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages // Nat. Biotechnol. — 2004. — Vol. 22. — P. 1115–1124.
- Servitja J.M., Ferrer J. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function // Diabetologia. — 2004. — Vol. 47. — P. 597 — 613.
- Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H. Glucagon-like peptide 1 (1–37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 5034–5039.
- Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting // Diabetes. — 2004. — Vol. 53. — P. 2143–2152.
- Teitelman G. Induction of beta-cell neogenesis by islet injury // Diab. Metab. Rev. — 1996. — Vol. 12. — P. 91–102.
- Timper K., Seboek D., Eberhardt M., et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin and glucagon expressing cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2006. — Vol. 341, 4. — P. 1135–1140.
- Treutelaar M.K., Skidmore J.M., Dias-Leme C.L., et al. Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet // Diabetes. — 2003. — Vol. 52. — P. 2503–2512.
- Trivedi H.L., Vanikar A.V., Thakker U., et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells combined with hematopoietic stem cell transplantation synthesize insulin // Transplantation Proceedings. — 2008. — Vol. 40, 4. — P. 5–9.
- Trucco M. Regeneration of pancreatic β -cell // J. Clin. Invest. — 2005. — Vol. 115. — P. 5–12.
- Verda L., Kim D.A., Ikehara S., et al. Hematopoietic mixed chimerism derived from allogeneic embryonic stem cells prevents autoimmune diabetes mellitus in NOD mice // Stem cells. — 2008. — Vol. 26, 2. — P. 1–6.
- Voltarelli J. C., Couri C., Stracieri A., et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus // JAMA. — 2007. — Vol. 297. — P. 69–76.
- Wang J., Elghazi L., Parker S.E., et al. The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation // Dev. Biol. — 2004. — Vol. 266. — P. 178–189.
- Wege H., Le H.T., Chui M.S., et al. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential // Gastroenterology. — 2003. — Vol. 124. — P. 432–444.
- Weir G.C., Bonner-Weir S. Beta-cell precursors — a work in progress // Nat. Biotechnol. — 2004. — Vol. 22. — P. 1–2.
- Yoshida S., Kajimoto Y., Yasuda T., et al. PDX-1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 5034–5039.
- Zalzman M., Gupta S., Giri R.K., et al. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 7253–7258.

Zaret K.S. Molecular genetics of early liver development // *Annu. Rev. Physiol.* — 1996. — Vol. 58. — P. 231–251.

Zimmet P., Alberti K.G.M.M., Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic // *Nature.* — 2001. — Vol. 414. — P. 782–787.

Zorina T.D., Subbotin V.M., Bertera S., et al. Recovery of endogenous β cells function in the NOD model of autoimmune diabetes // *Stem Cells.* — 2003. — Vol. 21. — P. 377–388.

ГЛАВА 26. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

26.1. Стволовые клетки пищевода и желудка

Пищевод человека имеет относительно ровную поверхность, на которой обнаруживаются инвагинации базальной мембраны в виде сосочков внутри расслаивающегося эпителия. Клеточная пролиферация обнаруживается в базальном и эпибазальном слое с более интенсивным делением в сосочковом базальном слое, чем в плоском межсосочковом слое [Seery, 2002]. СК пищевода, в отличие от других клеток базального и эпибазального слоев, не экспрессируют цитокератины-13, -14 и -15 [49]. Из пищевода человека была выделена фракция клеток, которые *in vitro* имели сходство со СК [Okumur, et al., 2003]. Эти клетки экспрессировали низкие уровни цитокератина-13, инволюкрина и интегрина $\beta 1$ и отличались высоким содержанием низкоаффинных рецепторов нейротропина р75NTR.

В желудке эпителий, покрывающий этот орган с внутренней поверхности, имеет складки, огибающие структуры, называемые желудочными железами. СК желудка локализуются и сохраняются в мезенхимальных нишах, выявляющихся по ходу железы (рис. 26.1 а). Клеточный поток в железах двухнаправленный: одни клетки устремляются вниз к основанию железы, а другие перемещаются вверх к наружному краю железы. Убедительное доказательство наличия в желудке мыши мультипотентных клеток представили Bjerknes и Cheng, которые, применив этилнитрозомочевину в качестве мутагена, у взрослых гемизиготных мышей ROSA26 получили *in vivo* мутантные клоны. В этих клонах, не экспрессирующих β -галактозидазу, обнаруживались клетки всех линий [97; Bjerknes, Cheng, 2002].

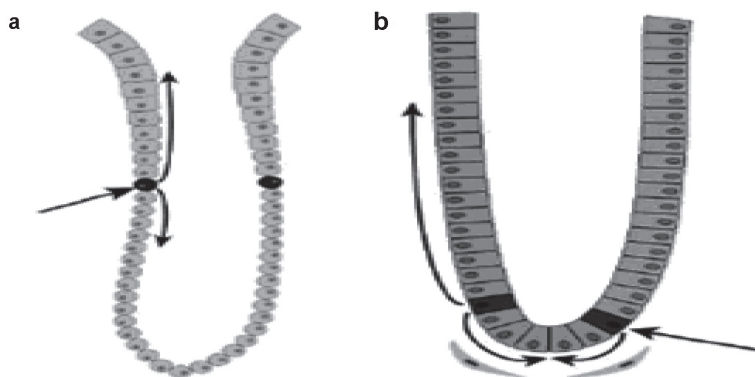


Рис. 26.1. Локализация стволовых клеток в железах желудка и в криптах тонкого кишечника

(а) В желудочных железах СК локализуются в регионе перешейка немного ниже желудочной ямки, а транзиторные амплифицирующиеся клетки располагаются над и под этим регионом. (б) В тонком кишечнике СК находятся в плоскости, соответствующей положению клеток 4–5 (счет от основания крипты). Миграция СК происходит главным образом вверх через выход из крипты, хотя может также осуществляться через клетки Панета в основании крипты. По Alison, et al. [49].

Авторы работы [Karam, et al., 2003] на основании ультраструктурного исследования ишемического региона желудка человека заключили, что СК являются, вероятно, клетки с мельчайшими плотными или пустотелыми секреторными гранулами. Специфическим маркером СК желудка может быть РНК-связывающий белок 39 kDa, известный как Musashi1 (Msi-1) [49]. Иммуногистохимически и с помощью гибридизации *in situ* было показано, что в норме Msi-1 определяется в местах обнаружения СК крипт лишь в небольшом количестве. После облучения наблюдается увеличение экспрессии Msi-1 в клоногенном регионе, что свидетельствует о возможности его использования в качестве маркера функциональных СК ЖКТ [Ведина и др., 2008].

26.2. Стволовые клетки тонкого и толстого кишечника

С люминальной поверхности кишечника покрывает цилиндрическим слизистым эпителием с железистыми колбовидными углублениями, называемыми криптами (рис. 26.2–26.4). В расположении некоторых крипт эпителий образует многочисленные ворсинки, выступающие в просвет кишечника. Крипты кишечника и желудочные железы снаружи окружены футляром из субэпителиальных миофибробластов кишечника (ISEMFs; intestinal subepithelial myofibroblasts) [Brittan, et al., 2002]. Эти клетки существуют в виде синцития, который простирается по всей lamina propria и сливается с перипитами кровеносных сосудов. ISEMFs тесно прилегают к эпителию кишечника и играют жизнеобеспечивающую роль в эпителиально-мезенхимальном взаимодействии. ISEMFs секретируют HGF, TGF β и фактор роста кератиноцитов (KGF), но рецепторы этих ростовых факторов локализованы на эпителиальных клетках. Таким образом, ISEMFs имеют существенное значение в регуляции дифференцировки эпителиальных клеток через секрецию перечисленных и, возможно, других факторов роста.



Рис. 26.2. Взаимосвязь между ворсинками тонкого кишечника и криптами

Крипты состоят из функциональных подразделений с преимущественно клеточными (перикрипальные фибробласты) и экстраклеточными (экстраклеточный матрикс и основная мембрана) регуляторами функции эпителия. Различают 4 основных типа клеток кишечника: энтероэндокринная клетка, бокаловидная клетка, цилиндрический (колоночный) эпителий и пролиферирующие предшественники (недифференцированные клетки цилиндрического эпителия и клетки Панета). Полностью зрелые и непролиферирующие энтероэндокринные, бокаловидные (слизистые) и цилиндрические клетки локализуются в ворсинках эпителия, тогда как клетки Панета и недифференцированные цилиндрические клетки (предполагаемые СК) выявляются в основании крипты. По Winton, 2001.

Кишечный тракт характеризуется быстрым оборотом эпителиальных клеток, который продолжается в течение всей жизни организма. Этот процесс регулируется и поддерживается популяцией СК, образующих клетки всех дифференцированных линий кишечного эпителия: цилиндрической (колоночной), бокаловидной (муцин-секретирующей), нейроэндокринной и клеток Панета [97; Ведина и др., 2008]. Кроме активных СК, в кишечнике содержатся также запасные СК, способные выполнять функции СК при необходимости, например, после повреждения. Показано, что в тонком кишечнике мыши каждая крипта содержит около 30–40 клоногенных потенциальных СК с меньшей чувствительностью к радиации и приблизительно 125–150 клеток, способных к делению, но не к регенерации крипт [Bjerknes, Cheng, 2002]. Весь цикл обновления эпителиоцитов у человека составляет 5–6 суток.

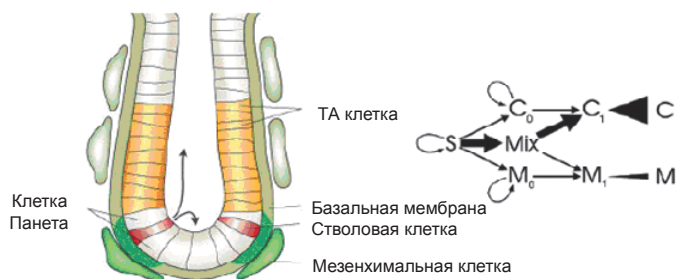


Рис. 26.3. Строение основания крипты кишечника (А) и схема образования дифференцированных клеток из предшественников (В)

(А) СК (темные) локализируются на базальной мембране рядом с клетками Панета. Потомки СК (полутемные), известные как транзиторные амплифицирующие клетки (ТАК), имеют в своем составе прогениторные клетки, перемещающиеся вверх крипты и продолжающие делиться до конечной дифференцировки. Мезенхимальные клетки окружают нишу, а их паракринные сигналы регулируют активность ниши.

(В) Мультипотентная СК (S) делится с образованием клеток-предшественников. Толстые стрелки показывают доминантные пути. Микс — кратковременно живущая (несколько дней) клетка-предшественник, способная к образованию кратковременно живущих (дни) цилиндрических и слизистых прогениторных клеток (C1 и M1). C₀ и M₀ — долгоживущие (месяцы) цилиндрические и слизистые прогениторные клетки, соответственно. Загнутые стрелки показывают возможную амплификацию популяции путем деления коммитированных прогениторных клеток. По Leedham, et al. [440].

Большая часть данных о количестве, локализации и пролиферации СК кишечника получена на мышах с применением маркеров ДНК. Было установлено, что мультипотентные СК располагаются в тонком кишечнике в основании крипт, примерно на 4 клетки выше клеток Панета; в толстом кишечнике — на дне крипт. Над зоной локализации СК находится большой участок, состоящий из транзиторных делящихся клеток, которые по краю крипты превращаются в зрелые клетки разных линий. Ежедневно в каждой крипте образуется от 200 до 300 дифференцированных клеток. Цикл крипты занимает приблизительно 108 дней в тощей кишке мыши и 9–18 лет в толстом кишечнике человека [Poulsom, et al., 2002].

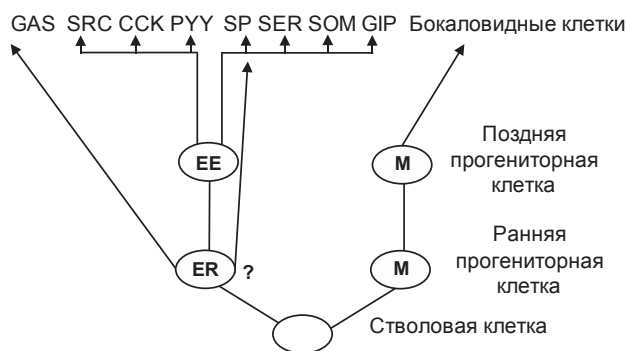


Рис. 26.4. Пути дифференцировки СК в тонком кишечнике мыши

Мультипотентные стволовые клетки могут образовывать ранние прогениторные клетки, которые затем дифференцируются в энтероэндокринную (EE) или слизисто-бокаловидную линии (M). На основании наличия промежуточных прогениторных клеток различных энтероэндокринных подтипов, существование которых подтверждается работами с удалением клеток, предполагается наличие отдельных путей для дифференцировки подтипов клеток, образующих гастрин (GAS), субстанцию P (SP), серотонин (SER), соматостатин (SOM) и желудочный ингибиторный пептид (GIP), из которых могут образоваться подтипы, вырабатывающие секретин (SEC), пептид YY (PYY) и холецистокинин (CCK). По Winton, 2001.



Рис. 26.5. Ниша СК в тонком кишечнике

Активная мультипотентная СК образует дочерние клетки, одна из которых (C_0) дает начало линии энтероцитов, а другая (M_0), возможно, образует бокаловидные, Панета и энтероэндокринные клетки. GLP-2, образуемый субпопуляцией энтероэндокринных клеток, стимулирует пролиферацию дочерних C_0 клеток путем взаимодействия с нейронами кишечной нервной системы, которые экспрессируют рецепторы GLP-2. Природа нейронального сигнала, действующего на C_0 , неизвестна. По работам [120; Brittan, Wright, 2004] подтипы, вырабатывающие секретин (SEC), пептид YY (PYY) и холецистокинин (CCK). По Winton, 2001.

Предполагают, что главным сигналом, запускающим деление крипты, является удвоение в ней числа СК. Крипта, достигающая к этому времени трехкратного увеличения в размерах, вначале подвергается базальной бифуркации, а затем претерпевает продольное деление с образованием в конечном итоге двух дочерних крипт. Активность мультипотентных СК в криптах регулируется паракринной секрецией ростовых факторов и цитокинов, образуемых окружающими мезенхимальными клетками [708].

Поведение СК ЖКТ опосредуется большим числом биохимических сигналов и находится под влиянием клеток в окружающей мезенхимальной нише (рис. 26.5). Изучение молекул и рецепторов, управляющих пролиферацией, дифференцировкой и функцией СК обеспечит более глубокое понимание биологии этих клеток.

При делении СК кишечника могут возникать, вероятно, 3 возможности [Loeffler, et al., 1993; 462, 463]: 1) асимметричное деление, при котором образуется одна СК и, по крайней мере, одна коммитированная прогениторная клетка, начинающая дифференцировку; 2) симметричное деление с самообновлением, при котором образуются две СК; и 3) симметричное деление с потерей СК, после которого обе дочерние клетки подвергаются дифференцировке. Большая часть делений СК — асимметричные, с сохранением матричной ДНК внутри СК, находящихся в нише. Это позволяет любые ошибки репликации ДНК передавать дифференцирующимся кратковременно живущим дочерним клеткам, осуществляя механизм защиты генома СК [Potten, et al., 2002]. Прогениторные клетки, образующиеся в крипте, сохраняют способность делиться до тех пор, пока окончательно не дифференцируются. Редкие симметричные деления СК приводят к постепенному стохастическому угасанию их линий и возникновению в нише преобладания одной линии — явление, получившее название «преемственность ниши» [440].

В тонком кишечнике мыши чуть выше клеток Панета была обнаружена экспрессия маркера НСК белка Mushashi-1 (Msh-1). У млекопитающих этот маркер повышает экспрессию транскрипционной репрессорной молекулы Hes-1, имеющей существенное значение для самообновления СК и подавления дифференцировки в нейральных клетках [цит. по 440]. Предполагают, что сочетанная локализация мРНК Msh-1 и белка Hes-1 может определять границы зоны СК в тонком кишечнике, хотя экспрессию Hes-1 выявляли также в делящихся клетках, мигрирующих из крипт. Но после разрушения крипты экспрессия Msh-1 может отмечаться во многих пролиферирующих клетках вне зоны СК, вероятно, как следствие длительного периода полужизни этого белка в быстро делящихся регенерирующих клетках. мРНК белка Msh-1 обнаруживают также

в клетках крипт толстого кишечника человека [377]. Potten с сотрудниками [Potten, et al., 2003] первыми применили для определения СК в кишечнике мыши инъекции 3Н-тимидина, интенсивное мечение которым выявило преимущественное сосредоточение СК в плоскости на 4–5 клеток выше основания крипт. Накопление меченого тимидина в СК происходит вследствие редкого деления этих клеток, а также благодаря механизму избирательного сохранения матричной ДНК в процессе дупликации (гипотеза иммортализации спирали) [131].

26.3. Дифференцировка региональных СК других тканей в клетки желудочно-кишечного тракта

В работе Krause и др. [402] впервые была показана дифференцировка СК КМ в эпителиальные клетки любого отдела ЖКТ (пищевод, желудок, тонкий и толстый кишечник). Спустя 11 месяцев после трансплантации сингенной самке мыши единичной ГСК из КМ самца и поддерживающих ее кроветворных клеток ткани животного-реципиента были проанализированы на наличие Y-хромосомы методом гибридизации *in situ* (FISH). Экспрессия Y-хромосомы была обнаружена в дифференцированных клетках легких, кожи и всего ЖКТ, включая разрастания в эпителии пищевода, желудка, ворсинках тонкого кишечника и криптах толстого кишечника. Число эпителиальных клеток, образующихся из ГСК, было обычно небольшим (0, 19 %–1, 81 % клеток ЖКТ), и авторам показалось сомнительным, что СК КМ могут образовать клетки эпителия ЖКТ. Однако в аналогичных экспериментах [Brittan, et al., 2002] также было обнаружено приживление донорских клеток в тонком и толстом кишечнике мыши и дифференцировку их в кишечные субэпителиальные миофибробласты (ISEMFs), локализующиеся в *lamina propria* под слизистой оболочкой. По мере развития процесса ISEMFs донорского происхождения образовывали колонки клеток, морфологически подобные тем, которые образуют собственные ISEMFs. В клинике эти исследователи обнаружили тем же методом ISEMFs в биоптатах тонкого кишечника женщин, получивших трансплантат КМ от мужчин-доноров. Эти ISEMFs экспрессировали Y-хромосому и имели фенотип SMA+, десмин-, F4/80-, CD34-. Спустя 14 дней 49,4 % миофибробластов вокруг крипт происходили из КМ донора, а спустя 6 недель 57,6 % этих клеток экспрессировали Y-хромосому.

Позднее было установлено, что у мышей с экспериментальным колитом число ISEMFs, происходящих из трансплантированного КМ, может достигать 70 % [Brittan, Wright, 2004]. Примечательно, что у женщин, больных раком кишечника, обостренным наличием хронической или острой РТПХ, после трансплантации КМ, отличающегося по полу, выявляли повышение приживления клеток донорского происхождения с обострением РТПХ [401]. Это позволяет предполагать, что клетки донорского КМ могут приживляться, дифференцироваться и пролиферировать по типу клональной экспансии. Однако до настоящего времени отсутствуют доказательства того, что из трансплантированных клеток КМ можно получить абсолютно здоровую и в полной мере функционирующую ткань ЖКТ. Кроме того, не удалось обнаружить клинических данных об излечении заболеваний ЖКТ после трансплантации клеток аллогенного КМ. Вместе с тем, работы в этом направлении имеют большое терапевтическое значение. В воспаленном кишечнике из трансплантированных СК КМ можно получать популяции ISEMFs, которые будут включаться в опосредованный цитокинами фиброгенез. С помощью миофибробластов можно обеспечить доставку цитокинов в кишечник больного для его лечения или предотвращения фиброза, а также влиять на рост и дифференцировку эпителиальных клеток ЖКТ [428].

Имеются данные также о других экзогенных источниках СК ЖКТ. На мышах была показана возможность получения эпителиальных клеток ворсинок и крипт 12-перстной кишки из высококлоногенной популяции печени [Sarun, et al., 1998] и отмечена возможность перепрограммирования НСК из мозга для обеспечения регенерации кишечника [Sims, 2000].

СК ЖКТ остаются в фокусе исследований, направленных на раскрытие генетических, молекулярных и клеточных механизмов развития и функционирования ЖКТ в норме и патологии. Клетки ЖКТ подвергаются постоянному обновлению и реагируют на повреждение регенераци-

ей и восстановлением популяции. В настоящее время большое значение уделяется изучению молекулярных событий, регулирующих развитие СК ЖКТ. Установлено, что большое значение для их нормального функционирования имеют сигнальный путь Wnt/ β -катенин и производные таких молекул, как APC (опухолевого супрессорного белка), Tcf-4, Fkh-6, Cdx-1 и Cdx-2. Проявляется роль молекулярных путей, определяющих пролиферацию коммитированных клеток в специфические линии эпителиальных клеток, в частности, сигнальных путей Notch-Delta, включающих транскрипционные факторы Hes1 и Math1, регулирующих дифференцировку бокаловидных, энтероэндокринных клеток и клеток Панета в тонком кишечнике. Установлены факторы, секретируемые мезенхимальными клетками и экспрессированные в этих клетках (KGF, HGF и др.), которые регулируют развитие слизистой ЖКТ и пролиферацию эпителия. Получены данные, свидетельствующие о том, что трансплантация клеток эпителиального слоя тонкого кишечника в организм облученного реципиента приводит к образованию селезеночных колоний, состоящих из гемопоэтических клеток [Ведина и др., 2008]. У летально облученного реципиента через 6 месяцев после трансплантации клеток эпителиального слоя тонкого кишечника выявляли восстановление численной популяции клеточных элементов периферической крови и функциональной активности клеток иммунной системы. Предполагают, что с помощью эпителиальных и субэпителиальных кишечных миофибробластных линий, происходящих из КМ, можно будет доставлять в места поражения Lamina propria терапевтические гены, способные восстановить поврежденный кишечник, например, при заболеваниях, вызывающих фиброз, таких как болезнь Крона. Выделение и получение характеристики СК ЖКТ имеет большой приоритет в изучении биологии пищеварительного канала.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Ведина Л. А., Сенников С. В., Труфакин В. А., Козлов В. А. Стволовые клетки эпителиального слоя тонкого кишечника // Клеточн. технол. в биол. и мед. — 2008. — N 2. — С. 63–66.
- Bjerknes M., Cheng H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2002. — Vol. 283. — P. 767–777.
- Brittan M., Hunt T., Jefferey R., et al. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon // Gut. — 2002. — Vol. 50. — P. 752–767.
- Brittan M., Wright N. A. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development // Gut. — 2004. — Vol. 53. — P. 899–910.
- Karam S. M., Straiton T., Hassan W. M., et al. Defining epithelial cell progenitors in the human oxyntic mucosa // Stem Cells. — 2003. — Vol. 21. — P. 322–336.
- Loeffler M., Birke A., Winton D., et al. Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt // J. Theor. Biol. — 1993. — Vol. 160. — P. 471–491.
- Okumura T., Shimada Y., Imamura M., et al. Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro // Oncogene. — 2003. — Vol. 22. — P. 4017–4026.
- Potten C. S., Booth C., Tudor G. L., et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1 // Differentiation. — 2003. — Vol. 71. — P. 28–41.
- Potten C. S., Owen G., Booth D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands // J. Cell Sci. — 2002. — Vol. 115. — P. 2381–2388.
- Poulsom R., Alison M. R., Forbes S. J., Wright N. A. Adult stem cell plasticity // J. Pathol. — 2002. — Vol. 197. — P. 441–456.
- Sarun S., Dalloul A. H., Laurent C., et al. Human CD34(+) thymocyte maturation: pre-T and NK cell differentiation on neonatal thymic stromal cell culture // Cell Immunol. — 1998. — Vol. 190. — P. 23–28.
- Seery J. P. Stem cells of the oesophageal epithelium // J. Cell Sci. — 2002. — Vol. 115. — P. 1783–1789.
- Sims D. E. Diversity within pericytes // Clin. Exp. Pharm. Physiol. — 2000. — Vol. 27. — P. 842–846.
- Winton D. J. Stem cells in the epithelium of the small intestine and colon // In: Stem cell Biology. — Eds: Marshak D. R., et al. Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. — P. 515–536.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из ведущих направлений медицины 21-го века может стать клиническое применение СК, с восстановительным потенциалом которых связаны перспективы лечения ряда соматических и генетических патологий человека. Такие прогнозы основаны на том, что на сегодняшний день открыты различные стволовые клетки, локализованные как внутри органов и тканей, так и экзогенного по отношению к ним происхождения, которые способны, с одной стороны, образовывать зрелые полноценные клетки, а с другой — влиять на резидентные стволовые клетки при трансплантации.

Важным условием для успешного клинического применения СК является решение вопросов, связанных с направленной регуляцией их самообновления, пролиферации и дифференцировки в желательный фенотип, что обеспечивает возможность полноценной заместительной терапии поврежденных клеток, тканей и даже органов. Очевидным преимуществом для регенеративной медицины будут обладать СК, получение и применение которых будет лишено этических и иммунологических проблем. Последнее обстоятельство определяет перспективность медицинских технологий, в основе которых лежит применение собственных (аутологических) стволовых клеток пациента.

Ранее считалось, что региональные СК во взрослом организме способны дифференцироваться только в типы клеток, гистогенетически связанные с тканью, из которой они были выделены (ортодоксальные дифференцировки). В последние годы появляется все больше данных, предполагающих либо высокую неортодоксальную пластичность этих клеток, либо свидетельствующих о гетерогенности региональных СК в составе ткани. Мы больше склоняемся к последнему мнению, но чтобы сделать окончательный вывод, региональные СК должны быть тщательно очищены и изучены, по возможности, на уровне единичной клетки.

Эффективная терапия стволовыми клетками возможна при выяснении ряда аспектов их взаимодействия с организмом хозяина, в частности, иммунной реакции реципиента на трансплантированные клетки; механизмов хоуминга, которые обеспечивают поступление СК в место повреждения; дифференцировки имплантированных клеток под влиянием местных сигналов.

Наиболее изученным типом региональных стволовых клеток являются мезенхимальные стромальные клетки (МСК), уже применяющиеся в клеточной терапии. МСК характеризуются высокой пластичностью в пределах тканей мезенхимальной природы, что позволяет использовать их для замещения и восстановления функции поврежденных тканей, прежде всего, кости, хряща, скелетных мышц, а также в лечении редкой генетической патологии — незавершенного остеогенеза. Кроме того, МСК можно применять с целью подавления иммунных конфликтов при аллогенной трансплантации и тяжелых аутоиммунных процессах. Известно, что эти клетки способны подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов, стимулированную аллогенными лимфоцитами периферической крови или митогенами, что может найти широкое применение в трансплантологии для продления сроков функционирования аллогенного трансплантата. Получены убедительные доказательства того, что МСК, благодаря отсутствию экспрессии антигенов HLA класса II, являются неиммуногенными или слабо иммуногенными клетками. В связи с этим они не вызывают иммунного ответа *in vitro* и не провоцируют острого отторжения *in vivo*. Следовательно, МСК обладают большим преимуществом перед другими типами клеток, так как могут безопасно использоваться для аллогенного введения. В частности, их можно применять в остром периоде заболевания, например, при инфаркте миокарда или инсульте. Имеющиеся в научной литературе обнадеживающие результаты преимущественно зарубежных доклинических и пилотных исследований по эффективности применения МСК требуют проведения серьезных клинических испытаний с целью стандартизации показаний к применению, протоколов и схем лечения.

Высоким регенеративным потенциалом обладает аллогенный фетальный биоматериал, характеризующийся высоким содержанием СК. Обычно он представляет собой гетерогенную популяцию клеток разных типов различной степени коммитированности, значительная часть

которых не обладает преимуществами МСК. В таких случаях длительное приживание введенных фетальных клеток может быть обеспечено индукцией толерантности реципиента к донорским антигенам или модификацией СК, например, на этапе криоконсервирования, необходимого для безопасного применения аллогенных клеток. Разработка технологий криоконсервирования и длительного хранения стволовых клеток с сохранением присущих им биологических свойств является обязательным условием успешного клинического применения СК.

Наряду с углубленным изучением биологии СК является актуальной разработка новых технологий использования этих клеток в медицине. Например, СК могут быть полезны для коррекции генетических заболеваний как средство доставки недостающих генов. При этом большое внимание следует уделять назначаемой дозе генного продукта, которая должна изменяться в зависимости от возраста больного, генетического фона и тяжести болезни.

Наиболее привлекательными и доступными заменителями ЭСК человека для клинического применения в настоящее время представляются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Они уже получены из кератиноцитов и фибробластов кожи, прогениторных клеток крови, клеток больных нейродегенеративными и генетическими заболеваниями с менделевской или комплексной наследственностью. В январе 2009 года Администрация США по лекарствам и продуктам питания (FDA) одобрила первое клиническое испытание ИПСК человека для лечения больных с повреждением спинного мозга.

Важным обстоятельством является то, что ИПСК могут быть получены без вирусной интеграции — путем включения репрограммирующих факторов с использованием плазмид, лентивирусов или транспозон. Ведется поиск химических соединений, которыми можно заменить один или два репрограммирующих фактора. Вместе с тем следует учитывать, что если даже в ИПСК не отмечается включение в геном трансгенов, в них могут происходить другие генетические изменения, для выявления которых может потребоваться секвенция всего генома клонов ИПСК.

Технология ИПСК позволяет преодолеть два важных препятствия внедрению ЭСК человека в клинику — проблему иммунного отторжения трансплантата и этические ограничения, связанные с использованием эмбрионов человека, — однако связана с рядом весомых трудностей, которые необходимо преодолеть. Прежде всего, это возможность образования тератом. Другая трудность связана с возможностью аберрантного репрограммирования, которое может привести к повреждению способности к дифференцировке и повысит риск образования незрелой тератомы после направленной дифференцировки. Таким образом, неполное репрограммирование соматических клеток в ИПСК может нарушить дифференцировку в желаемый тип клеток. Поэтому любые ИПСК, полученные любым методом из любого источника клеток, должны подвергаться тщательному исследованию до клинического применения для подтверждения их безопасности для человека. Несмотря на эти ограничения и предостережения, потенциал индуцированных плюрипотентных стволовых клеток является огромным. Следует заметить, что реализация этого потенциала зависит не только от научных достижений, но и от общественного мнения. Если отношение общества к генетически модифицированным клеткам будет таким же, как к генетически модифицированным продуктам питания, то он останется нераскрытым.

Еще одной областью медицинского использования СК является тканевая инженерия, мультидисциплинарное бурно развивающееся направление биотехнологии, нацеленное на создание живых функционирующих биоинженерных продуктов для последующей замены поврежденных тканей пациентов. Оно основано на выращивании стволовых клеток вне организма в трехмерных условиях с использованием носителей из различных природных или искусственных материалов. Биоинженерные конструкции могут быть различных размеров: от микросфер, пригодных для инъекционного введения, до аналогов фрагментов тканей или целых органов: уже появились сообщения о создании на основе СК биоинженерных органов: мочевого пузыря, трахеи, сердца и др. Очевидно, что дальнейшее развитие этого направления является исключительно важным для терапевтического применения СК.

СК можно использовать не только для терапевтических целей, но и для проведения лекарственного или токсикологического скрининга *in vitro*, создания клеточных моделей болезней в культуре. В частности, гепатоциты, полученные из СК от лиц с разным уровнем цитохрома Р450, могут быть использованы для определения индивидуальной токсичности лекарственных препаратов. Еще одним направлением является диагностика заболеваний, обусловленных дефицитом или аномалиями СК. Например, известна и клинически обоснована концепция атеросклероза, связывающая начальные фазы поражения артериальной стенки с ускоренным старением эндотелиальной выстилки. Напомним, что эндотелий крупных магистральных артерий не имеет собственных запасов СК, и его обновление происходит за счет эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), поступающих в кровотоки из КМ. Поэтому первые доклинические стадии заболевания (до ишемической болезни сердца) можно диагностировать по дефициту ЭПК в кровотоке.

Материалы, изложенные в настоящей книге, представлены результатами, полученными преимущественно зарубежными авторами. Это обусловлено существенным отставанием отечественных исследований в области стволовых клеток, причиной которого является отсутствие целевого финансирования, недостаточная разработка нормативно-правовой и этической базы, а также низкий уровень кооперации специалистов разных профилей, необходимой для более эффективной разработки этой проблемы.

Существующее отставание можно преодолеть путем создания целевых научно-технических программ фундаментальных и прикладных исследований стволовых клеток. Поддержка и финансирование таких программ со стороны государства позволит решить многие вопросы, связанные с биологией стволовых клеток, разработать и внедрить технологии их клинического применения, что улучшит здоровье и качество жизни нации. Таким образом, несмотря на высокий потенциал технологий, основанных на стволовых клетках, остается еще много вопросов, на которые надо получить ответы, прежде чем эти технологии войдут в арсенал средств регенеративной медицины.

ГЛОССАРИЙ

Амплификация — процесс образования дополнительных копий участков хромосомной ДНК, как правило, содержащих определенные гены; а также накопление копий определенной нуклеотидной последовательности во время ПЦР.

Апоптоз — запрограммированная гибель прогениторных или дифференцированных клеток.

Асимметричное деление стволовых клеток — деление СК путем митоза, в результате которого образуются дочерние клетки с разными свойствами: одна клетка остается стволовой, а другая вступает в пролиферацию и дифференцировку.

Бета-галактозидаза (β-gal) — фермент, катализирующий расщепление лактозы. Блесточиста — стадия развития зародыш млекопитающих и человека. Морфологически блестяточиста представляет собой шар из нескольких сотен клеток, состоящий из внешнего слоя (трофобластодермы) и внутренней клеточной массы (эмбриобласта).

Вектор-переносчик — самореплицирующаяся (автономная) молекула нуклеиновой кислоты, используемая в генной инженерии для переноса генов из организма донора в организм реципиента; главное свойство — наличие сайта, в котором возможно встраивание данного полинуклеотида.

Гаплоидная клетка — клетка, характеризующаяся наличием одного набора хромосом (n); в норме гаплоидными являются гаметы.

Генная клеточная терапия — лечение путем замещения поврежденных клеток генетически модифицированными.

Генотип — совокупность генов.

Гомозиготность — наличие идентичных аллелей в одном или нескольких локусах.

Гомеобокс — специфическая консервативная последовательность ДНК длиной около 180 пар нуклеотидов, расположенная в 3'-концевых частях генов, кодирующая ДНК-связывающий домен полипептида.

Гетерокарион — соматическая клетка, содержащая два (или более) гаплоидных, генотипически различающихся ядра. Такие клетки образуются в результате гетерокариоза и распространены у грибов.

Детерминация — возникновение качественных различий между частями развивающегося организма, предшествующее дифференцировке органов и тканей; клетки можно считать претерпевшими Д., если после трансплантации они могут развиваться в «свой» орган (ткань).

Диплоидная клетка — клетка, включающая два гомологичных набора хромосом ($2n$). Основная характеристика кариотипа организма (вида) определяется по числу хромосом в метафазе соматического митоза. Например, у человека в норме $2n=46$.

Дифференцировка клеток — (от фр. differentiation — расчленение, расслоение) процесс реализации генетически обусловленной программы формирования специализированного фенотипа клеток, отражающего их способность к тем или иным профильным функциям.

Домен — участок полипептидной цепи, выполняющий какую-либо белковую функцию (например, цитоплазматический Д., трансмембранный Д. и т.д.). Каждый Д. кодируется определенным участком гена.

Заместительная клеточная терапия — раздел медицины, который занимается реконструкцией ткани путем замещения поврежденных клеток стволовыми или их дифференцированными потомками.

Иммортализация — значительное увеличение числа делений клеток без трансформации в опухоль, обычно за счет введения различных генетических конструкций.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки — плюрипотентные стволовые клетки, полученные из зрелых соматических клеток обычно путем трансфекции определенными генетическими конструкциями.

Клетки-предшественники — слабо дифференцированные клетки, участвующие в образовании тканей за счет пролиферации и дифференцировки, но неспособные к самообновлению.

Клон — потомство клеток, возникшее из одной клетки-предшественника.

Клонирование — получение идентичных потомков при помощи бесполого размножения.

Коммитирование — (англ. to commit — поручать, придавать, фиксировать) — запрограммированность клеток-предшественников на определенное направление дифференцировки или на синтез определенного продукта.

Лиганд — молекула, взаимодействующая с комплементарным участком определенной структуры; например, кислород является Л. для гемоглобина.

Мастер-ген — основной, ключевой ген, кодирующий определенный качественный признак.

Мезенхима — зародышевая соединительная ткань большинства многоклеточных животных и человека. Мезенхима возникает за счет клеток разных зародышевых листков (эктодермы, энтодермы и мезодермы). Из мезенхимы образуются соединительная ткань, кровеносные сосуды, мышцы, висцеральный скелет, пигментные клетки и дерма кожи.

Мультипотентность — способность региональной СК взрослого организма или плода дифференцироваться в несколько типов клеток.

Ниша — микроокружение стволовых клеток, обеспечивающее их сохранение в недифференцированном состоянии.

Нокаутные мыши — лабораторные мыши, у которых один или несколько генов удалены или изменены так, чтобы продукт гена потерял свою функцию. Нокаут гена позволяет исследовать последствия такой мутации.

Пероксисома, микротельце — плазматические пузырьки диаметром 0,3–1,5 мкм, производные эндоплазматического ретикулума, участвующие в расщеплении перекиси водорода и в обмене липидов и углеводов.

Плазмиды — кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

Пластичность — предполагаемая способность региональных СК одной ткани образовывать типы дифференцированных клеток другой ткани.

Плюрипотентность — способность стволовых клеток дифференцироваться во все типы клеток организма.

Полипloidия — кратно увеличенное, по отношению к диплоидному набору, число хромосом.

Прогениторные клетки — коммитированные к дифференцировке стволовые клетки, неспособные к самообновлению. Активно пролиферируют перед дифференцировкой, часто называют транзиторными.

Промотор — область прикрепления транскрипционного комплекса к ДНК; последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой в качестве стартовой площадки для начала специфической транскрипции.

Регенеративная медицина — клиническая дисциплина, нацеленная на использование клеточной терапии для восстановления поврежденных органов и тканей.

Региональные стволовые клетки — стволовые клетки фетальных или взрослых тканей, способные формировать линии клеток этих тканей.

Рекомбинация — перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинационной изменчивости.

Cre/lox-рекомбиназа — рекомбинационная система, происходящая из ДНК бактериофага P1. Фермент Cre-рекомбиназа, определяющая последовательность нуклеотидов (мотив) на участках 34-bp, называемых участками loxP. Фрагмент ДНК, фланкированный участками loxP, может быть вырезан ферментом Cre. Эта рекомбинационная система применяется для получения условных мутантов в клетках млекопитающих.

Рестрикция — ограничение выбора направлений дифференцировки мультипотентных стволовых клеток.

Ретровирусы — группа РНК-содержащих вирусов диаметром 70–120 нм, капсид которых заключен в липопротеиновую оболочку; каждая частица включает по 2 идентичные молекулы РНК и связанные с ними молекулы обратной транскриптазы. Широко используются в генной инженерии в качестве векторов для введения чужеродных генов в клетки животных.

РТПХ — реакция трансплантат против хозяина. Развивается после трансплантации биологического материала, содержащего функционирующие иммунные клетки, при нарушении трансплантатом барьеров гистосовместимости.

Секвенция — определение последовательности нуклеотидов ДНК

Система Lac Z для анализа гибридных клеток; используется вследствие легкости проведения ферментной цветной реакции с X-gal. **Lac Z** — оперон, регулирующий ген лактозы; участвует в транспорте и метаболизме лактозы у *E. Coli* и некоторых других кишечных бактерий; **X-gal** — система для определения содержания единиц **β -gal** (см) в культуральной среде клеток. Изменение цвета колоний от белого до голубого соответствует 20–100 единицам β -gal.

Стволовые клетки (СК) — недифференцированные клетки, способные к самообновлению и образованию нескольких типов дифференцированных потомков.

Тератома — тип опухоли, образованной агрегацией клеток, происходящих из нескольких типов клеток.

Тканевая инженерия — мультидисциплинарное направление биотехнологии, направленное на создание в лаборатории функционирующих тканей для последующей замены поврежденных.

Толерантность иммунологическая — избирательное отсутствие ответа на специфический антиген.

Тотипотентность — способность стволовых клеток дифференцироваться во все типы клеток с образованием полноценного организма.

Трансгенный организм — организм, геном которого (или геномы отдельных его клеток или тканей) включает чужеродный генетический материал, внесенный с использованием методов генной инженерии.

Трансдифференцировка — процесс дифференцировки тканеспецифической стволовой или прогениторной клетки в атипическую клеточную линию.

Трансдукция — процесс искусственного переноса генетического материала в эукариотические клетки с помощью очищенной ДНК.

Транскрипт — молекула РНК, образующаяся в результате транскрипции (экспрессия соответствующего гена или участка ДНК).

Транспозоны — один из классов мобильных элементов генома, которые встраиваясь в геном могут вызывать мутации.

Трансдетерминация — изменение дифференцировки какой-либо клетки или группы клеток, не связанное с соматической мутацией.

Факторы транскрипции — вспомогательные ядерные белки-кофакторы, которые присоединяются к ДНК-РНК-полимеразе и помогают избирательному считыванию генов на уровне промоторов. Они регулируют состояние активности генов, обеспечивающих линейно-специфическую дифференцировку.

Фенотип — совокупность внутренних и внешних характеристик, присущих определенной стадии развития.

Химера — мозаичный организм, включающий клетки, ткани или органы чужеродных организмов (разных видов или генотипов в пределах одного вида).

Хроматин — нуклеопротеидный комплекс, составляющий хромосомы эукариотических клеток; включает ДНК, гистоны и различные негистоновые белки.

Экспансия стволовых клеток — размножение без потери основных свойств.

Экспрессия — морфологическое или функциональное проявление генетического признака.

Эктодерма — наружный зародышевый листок многоклеточных животных; из которого развиваются нервная система, органы чувств, висцеральный скелет, покровы и их производные.

ЭКМ — экстраклеточный матрикс.

Эмбрионидные тельца (embryoid bodies) — агрегаты стволовых клеток, вступающих на путь дифференцировки.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) — плюрипотентные стволовые клетки внутренней массы бластоцисты.

c-kit (CD117) — белковый тирозин-киназный рецептор, экспрессированный на примитивных кроветворных клетках, а также на клетках других тканей. Его лиганд — steel factor (фактор стволовых клеток).

c-met — мембранный рецептор для фактора роста гепатоцитов (HGF).

Flk1 — один из рецепторов VEGF; самый ранний маркер дифференцировки эндотелиальных клеток-предшественников.

Lin — смесь моноклональных антител, направленных против поверхностных антигенов, обнаруживаемых на зрелых клетках разных линий.

MHC complex — major histocompatibility complex — группа генов, контролирующих главные поверхностные антигены клеток донора, на которые срабатывает реакция иммунного отторжения при пересадке в организм реципиента.

Thy-1 (CD90) — фосфатидилинозитоловый белок, экспрессированный на ГСК и Т-лимфоцитах; у мышей аллель Thy1.1 (CD90.1) экспрессирован на ГСК на низких уровнях, а аллель Thy1.2 (CD90.2) вообще не представлен. У человека Thy1 используется как маркер ГСК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- α -ГМА** — α -актин гладких мышц
ВМБ — внутренняя масса бластоцисты (эмбриобласт)
ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
ГСК — гемопоэтическая стволовая клетка
КМ — костный мозг
МСК — мультипотентная мезенхимальная стволовая клетка, мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка
НСК — нейральная стволовая клетка
ПЖ — поджелудочная железа
РТПХ — реакция трансплантат против хозяина
СК — стволовая клетка
ТКСК — тканекоммитированная стволовая клетка
ФТС — фетальная телячья сыворотка
ЦНС — центральная нервная система
ЩФ — щелочная фосфатаза (alkaline phosphatase: ALP)
ЭКМ — экстраклеточный матрикс
ЭЗК — эмбриональная зародышевая клетка
ЭСК — эмбриональная стволовая клетка
BMP — bone morphogenetic proteins, костные морфогенетические белки
EGF — epidermal growth factor — фактор роста эпидермы
FAH — фумарилацетоацетат гидролаза
FGF — fibroblast growth factor — фактор роста фибробластов fibroblast growth factor — фактор роста фибробластов — универсальный стимулятор прогениторных клеток в клоне ЭСК
G-CSF — колониестимулирующий фактор гранулоцитов
GFAP — Glial fibrillary acidic protein, глиальный кислый фибриллярный белок
GGT — гамма-глутамилтранспептидаза
GFP — green fluorescent protein
HGF — hepatocyte growth factor — фактор роста гепатоцитов
HLA — human leukocyte antigens — лейкоцитарные антигены человека
HNF-3 β — ядерный фактор гепатоцитов — 3 β
ICAM — intercellular adhesion molecule — межклеточная молекула адгезии
IGF — insulin-like growth factor — инсулиноподобный фактор роста
IL — interleukin — интерлейкин
INF γ — interferon γ — интерферон гамма
LIF — leukemia inhibitory factor — лейкемию подавляющий фактор
NCAM — neural cell adhesion molecule — молекула адгезии нервных клеток
NGF — nerve growth factor — фактор роста нерва
PDGF — platelet-derived growth factor — ростовой фактор, тромбоцитарный фактор роста
SCF — stem cell factor — фактор стволовых клеток
SDF-1 — α -хемокин, стромальный фактор 1
SGZ — subgranular zone — субгранулярная зона
SVZ — subventricular zone — субвентрикулярная зона
TGF — transforming growth factor — трансформирующий фактор роста
TNF — tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли
VEGF — vascular endothelial growth factor — фактор роста эндотелия сосудов

СВОДНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова М. А., Подгорный О. В., Полтавцева Р. А. и др. Структура и клеточный состав сфер, культивированных из сетчатки плодов человека // Клеточные технологии в биологии и медицине — 2006. — № 3. — С. 171–179.
2. Афанасьев С. А., Свиридов И. Н., Шахов В. П. и др. Присутствие колониеобразующих клеток в миокарде крыс после деструктивного воздействия и интрамиокардиальной трансплантации клеток костного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине — 2008. — № 1. — С. 29–33.
3. Беленков Л. Н., Агеев Ф. Т., Мачеев В. и др. Мобилизация стволовых клеток костного мозга в лечении больных с сердечной недостаточностью. Протокол и первые результаты испытаний // Кардиология. — 2003. — Т. 43. — С. 7–12.
4. Владимирская Е. Б., Майорова О. А., Румянцев С. А. и др. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. — М.: Медпрактика. — 2005. — 392 с.
5. Возианов А. Ф., Тронько Н. Д., Ефимов А. С., Пастер И. П. Использование стволовых клеток для лечения сахарного диабета // Кліні. мед. — 2006. — Т. 12, 1. — С. 269–281.
6. Волошина Н. П., Васильовский В. В., Микулинский Ю. Е. и др. Аутотерапия клетками стромы костного мозга, индуцированными в нервные, больных с хроническими заболеваниями ЦНС (рассеянный склероз, болезнь Паркинсона) // Укр. нейрохір. журн. — 2003. — Т. 3. — С. 61–67.
7. Герасимов Ю. В., Фриденштейн А. Г. Потенциалы дифференцировки клональных штаммов фибробластов костного мозга // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. — 1986. — Т. 101. — С. 717–719.
8. Гладких Ю. В. Актуальные вопросы лечения сахарного диабета стволовыми клетками // Кліні. Трансплантология. — 2008. — Т. 10. — С. 247–250.
9. Гриценко В. И., Гольцев А. Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиологии. — 2002. — № 1. — С. 54–84.
10. Дыбан А. П., Дыбан П. А. Стволовые клетки в экспериментальной и клинической медицине // Мед. академ. журн. — 2002. — Т. 2, 3. — С. 3–25.
11. Запорожан В. Н., Бажора Ю. И. Стволовые клетки. — Одесса: Одесский университет. — 2004. — 228 с.
12. Зозуля Ю. А., Лисяный Н. И., Цымбалюк В. И. и др. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток. — Киев: ООО УИПК «ЕксОб». — 2005. — 368 с.
13. Ибраимова Н. М., Наханов А. К., Битов Н. Т. и др. Изучение влияния ростовых факторов при культивировании гемопоэтических стволовых клеток человека // Трансплантология. — 2008. — Том 10, 1. — С. 130–134.
14. Кругляков П. В., Соколова И. Б., Полянцев Д. Г. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма // Цитология. — 2008. — Т. 50, 7. — С. 557 — 567.
15. Кухарчук А. Л., Радченко В. В., Сирман В. М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. — Киев, 2004. — 504 с.
16. Кухарчук А. Л., Радченко В. В. Эмбриональные прогениторные клетки, иммунологическая толерантность и старение организма // Трансплантология. — 2008. — Т. 10, 1. — С. 51–54.
17. Кухарчук А. А., Паляница С. С., Бихунов В. Л. Сахарный диабет, регенеративная медицина и иммунологическая толерантность // Трансплантология. — 2008. — Т. 10, 1. — С. 44–50.
18. Малайцев В. В., Богданова И. М., Сухих Г. Т. Современные представления о биологии стволовой клетки // Архив патол. — 2002. — № 4. — С. 7–11.
19. Мусина Р. А., Бекчанова Е. С., Белявский А. В. и др. Мезенхимальные стволовые клетки пуповинной крови // Клеточн. технол. в биол. и мед. — 2007. — № 1. — С. 16–20.
20. Мусина Р. А., Белявский А. В., Тарусова О. В. и др. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови // Клеточн. технол. в биол. и мед. — 2008. — № 2. — С. 110–115.

21. Нифонтова И. Н., Свиная Д. А., Дризе Н. И. Стромальные клоногенные предшественники кроветворного микроокружения и их место в иерархии мезенхимных стволовых клеток // Клеточн. технол. в биол. и мед. — 2008. — № 2. — С. 115–118.
22. Петренко А. Ю., Грищенко В. И. Стволовые кроветворные клетки из разных источников // Междунар. мед. журн. — 2003. — Т. 1. — С. 123–129.
23. Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г. и др. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют фенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток // Трансплантология. 2008. — Т. 10, 1. — С. 306–308.
24. Пятикоп В. А., Щегельская Е. А., Микулинский Ю. Е. и др. Восстановление структурно-функциональных параметров у крыс с криогенной травмой головного мозга после трансплантации клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты // Пробл. криобиологии. — 2005. — Т. 15, № 3. — С. 449–451.
25. Репин В. С., Ржанникова А. А., Шаменков Д. А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. — Москва: РеМетЭкс, 2002. — 218 с.
26. Репин В. С., Сабурова И. Н. Эмбриональные и взрослые стволовые клетки: место в современной медицине // Лабораторная медицина. — 2006. — № 8. — С. 33–43.
27. Репин В. С., Сабурова И. Н., Сухих Г. Т. Клеточная биология фетальных тканей и фундаментальная медицина // Клеточн. технол. в биол. и мед. — 2007. — № 3. — С. 123–132.
28. Ройт А. Основы иммунологии. — Москва: Мир, 1991. — 327 с.
29. Романов Ю. А., Даревская А. Н., Кабаева Н. В., Антонова О. А. Выбор оптимальных условий культивирования мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга и жировой ткани человека // Клеточн. технол. в биол. и мед. — 2006. — Т. 4. — С. 206–211.
30. Рубинов Б. Е. ЭСК человека: новый путь для лечения болезней человека // Пробл. репродукции. — 2004. — № 4. — С. 51–54.
31. Спивак Н. Я., Сухих Г. Т., Богданова И. М. и др. Генно-инженерные технологии и стволовые клетки // Трансплантология. — 2008. — Том 10, 1. — С. 18–27.
32. Суздальцева Ю. Г., Бурунова И. И., Петракова Н. В. и др. Сравнительный анализ цитотипов клеток мезенхимального ряда, изолированных из тканей человека // Клеточн. технол. в биол. и мед. — 2007. — № 1. — С. 38–45.
33. Сухих Г. Т., Малайцев И. И., Богданова И. М. Перспективы использования фетальных стволовых/прогениторных клеток человека в клеточной терапии // Клеточн. технол. в биол. и мед. — 2008. — № 1. — С. 5–14.
34. Сухих Г. Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине. Настоящее и будущее // Бюл. эксперим. биол. мед. — 1998. — Т. 126, 1. — С. 3–13.
35. Траптуев Д. О., Парфёнова Е. В., Ткачук В. А., Марч К. Л. Стромальные клетки жировой ткани — пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом // Цитология. — 2006. — Т. 48, № 2. — С. 83–93.
36. Хейфлик Л. Как и почему мы стареем? — М.: Вече. — 1999. — 422 с.
37. Цымбалюк В. И., Медведев В. В. Нейрогенные стволовые клетки. — Киев: «Коваль», 2005. — 596 с.
38. Чидгей А. П., Лейтон Д., Траунсон А., Бойд Р. Л. Стратегии индукции толерантности в терапии, основанной на трансплантации стволовых клеток // Трансплантология. — 2008. — Том 10, 1. — С. 28–43.
39. Щегельская Е. А., Микулинский Ю. Е., Кульшин В. Е. и др. Дифференцировка *in vitro* клеток стромы костного мозга мыши в клетки-предшественники нейронов и гепатоцитов // Эксперим. і кліні. медицина. — 2002. — Т. 1. — С. 16–20.
40. Щегельская Е. А., Микулинский Ю. Е., Ревущин А. В. и др. Плюрипотентность клеток стромы костного мозга и перспектива их использования в клеточной терапии // Онтогенез. — 2003. — Т. 34, 3. — С. 228–235.

41. *Abedi M., Greer D.A., Colvin G.A., et al.* Robust conversion of marrow cells to skeletal muscle with formation of marrow-derived muscle cell colonies: a multifactorial process // *Exp Hematol.* — 2004. — Vol. 32. — P. 426–434.
42. *Abkowitz J.L.* Can human hematopoietic stem cells become skin, gut or liver cells? // *New. Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 346, N. 10. — P. 770–772.
43. *About I., Bottero M.-J., de Denato P., et al.* Human dentin production in vitro // *Exp. Cell Research.* 2000. — Vol. 258. — P. 33–41.
44. *Agnes A., Rychkov G., Shi S., et al.* Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues // *Stem cells.* — 2008. — Vol. 26. — P. 1787 — 1795.
45. *Adhikary S., Eilers M.* Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. — Vol. 6. — P. 635 — 645.
46. *Adjaye J., Byskov A. G., Cibelli J.B., et al.* Pluripotency and differentiation in embryos and stem cells // *Int. J. Dev. Biol.* — 2008. — Vol. 52. — P. 801–809.
47. *Airey J.A., Almeida-Porada G., Colletti E.J., et al.* Human mesenchymal stem cell form Purkinje fiber in fetal sheep heart // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109. — P. 1401–1407.
48. *Alhadlag A., Mao J.J.* Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells // *J. Dent. Res.* — 2003. — Vol. 82, 12. — P. 951–956.
49. *Alison M.R., Brittan M., Lovell M.J., Wright N.A.* Markers of adult tissue-based stem cells // *HEP*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Eds: Wobus AM. & Boheler KR. 2006. — Vol. 174. — P. 227
50. *Alison M.R., Poulsom R., Otto W.R., et al.* Plastic adult stem cells: will they graduate from the school of hard knocks? // *J. Cell Sci.* — 2003. — Vol. 116. — P. 599–603.
51. *Alison M.R., Vig P., Russo F., et al.* Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? // *Cell Prolif.* — 2004. — Vol. 37. — P. 1–21.
52. *Alitalo K., Carmeliet P.* Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in healthy and disease // *Cancer Cell.* — 2002. — Vol. 1. — P. 219–227.
53. *Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89. — P. 10114–10118.
54. *Almeida-Porada G., Porada C.D., Chamberlain J., et al.* Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep // *Blood.* — 2004. — Vol. 104. — P. 2582–2590.
55. *Almeida-Porada G., Porada C.D., Zanjani E.D.* Plasticity of human stem cells in the fetal sheep model of human stem cell transplantation // *Int. J. Hematol.* — 2004. — Vol. 200. — P. 123–135.
56. *Alonso L., Fuchs E.* Stem cells of the skin epithelium // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100, 1. — P. 11830–11835.
57. *Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., et al.* Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes // *Nature.* — 2003. — Vol. 425. — P. 968–973.
58. *Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S., et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture // *Dev. Biol.* — 2000. — Vol. 227. — P. 271–278.
59. *Amit M., Shariki C., Margulets V., et al.* Feeder layer— and serum-free culture of human embryonic stem cells // *Biol Reprod.* — 2004. — Vol. 70. — P. 837–845.
60. *Anderson D.S., Gage F.H., Weissman I.L.* Can stem cells cross lineage boundaries? // *Nat. Med.* — 2001. — Vol. 7. — P. 393–395.
61. *Anderson J.M.* Multinucleated giant cells // *Curr. Opin. Hematol.* — 2000. — Vol. 7. — P. 40–47.
62. *Anklesaria P., Kase K., Glowacki J., et al.* Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line in vivo stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1987. — Vol. 84. — P. 7681–7685.
63. *Ara T., Nakamura Y., Egawa T., et al.* Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 5319–5323.

64. *Armstrong L., Lako M., Dean W., Stojkovic M.* Epigenetic modification is central to genome re-programming in somatic cell nuclear transfer // *Stem Cells*. — 2006. — Vol. 24. — P. 805–814.
65. *Asahara T., Masuda H., Takahashi T., et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization // *Circ. Res.* — 1999. — Vol. 85. — P. 221–228.
66. *Askari A. T., Knzek S., Popovic ZB., et al.* Effect of stromal cell derived factor 1 on stem cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy // *Lancet*. — 2003. — Vol. 362. — P. 697–703.
67. *Assady S., Maor G., Amit M., et al.* Insulin production by human embryonic stem cells// *Diabetes*. — 2001. — Vol. 50, 8. — P. 1691–1697.
68. *Avital I., Inderbitzin D., Takeshi A., et al.* Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Com.* — 2001. — Vol. 288, 1. — P. 156–164.
69. *Azuara V., Perry P., Sauer S., et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines // *Nat. Cell Biol.* — 2006. — Vol. 8. — P. 532–538.
70. *Bailey A. S., Shuguang J., Afentoulis M., et al.* Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells // *Blood*. — 2004. — Vol. 103. — P. 13–19.
71. *Bain G., Kitchens D., Yao M., et al.* Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro// *Dev Biol.* — 1995. — Vol. 168. — P. 342–357.
72. *Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., et al.* Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1// *J. Neurochem.* 1999. — Vol. 73. — P. 2348–2357.
73. *Baksh D., Davies J. E., Zandstra P. W.* Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion // *Exp. Hematol.* — 2003. — Vol. 31. — P. 723–732.
74. *Baksh D., Song L., Tuan R. S.* Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy // *J. Cell. Mol. Med.* — 2004. — Vol. 8. — P. 301–316.
75. *Balemans W., Van H. W.* Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators // *Dev. Biol.* — 2002. — Vol. 250. — P. 231–250.
76. *Barberi T., Klivenyi P., Calingasan N. Y., et al.* Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice // *Nat. Biotechnol.* — 2003. — Vol. 21,10. — P. 1200–1207.
77. *Barda-Saad M., Shav-Tal Y., Rozenszajn A. L., et al.* The mesenchyme expresses T cell receptor mRNAs: relevance to cell growth control // *Oncogene*. — 2002. — Vol. 21. — P. 2029–2036.
78. *Barry F., Boynton R. E., Haynesworth S., et al.* The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1999. — Vol. 265. — P. 134–139.
79. *Barry F. P., Murphy J. M.* Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* — 2004. — Vol. 36. — P. 568–584.
80. *Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo // *Exp Hematol.* — 2002. — Vol. 30, 1. — P. 42–48.
81. *Bartlett P. F.* Pluripotential hemopoietic stem cells in adult mouse brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1992. — Vol. 79. — P. 2722–2725.
82. *Behr R., Heneweer C., Viebahn C., et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in colonies of rhesus monkey ESC: a model for processes involved in gastrulation // *Stem Cells*. — 2005. — Vol. 23. — P. 805–816.
83. *Bendall S. C., Stewart M. H., Menendez P., et al.* IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro // *Nature*. — 2007. — Vol. 448. — P. 1015–1021.

84. Ben-Shushan E., Thompson J.R., Gudas L.J., et al. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a ovel protein, Rox-1, binding to an adjacent site // *Mol. Cell. Biol.* — 1998. — Vol. 18. — P. 1666–1878.
85. Berger C.N., Sturm K.S. Self renewal of embryonic stem cells in the absence of feeder cells and exogenous leukaemia inhibitory factor // *Growth Factors.* — 1997. — Vol. 14. — P. 145–159.
86. Beresford J.N., Bennett J.H., Devlin C., et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytes and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. // *J. Cell Sci.* 1992. — Vol. 102. — P. 341–351.
87. Berninger B., Hack M.A., Gotz M. Neural stem cells: on where they hide, in which disguise, and how we may lure them out // *Handb. Exp. Pharmacol.* — 2006. — Vol. 174, — P. 319–360.
88. Bhattacharya B., Miura T., Brandenberger R., et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature// *Blood.* — 2004. — Vol. 103. — P. 2956–2964.
89. Bianchi G., Banfi A., Mastrogiacomo M., et al. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2 // *Exp. Cell. Res.* — 2003. — Vol. 287. — P. 98–105.
90. Bianco P., Boyde A. Confocal images of marrow stromal (Westen-Bainton) cells // *Histochemistry.* — 1993. — Vol. 100. — P. 93–96.
91. Bianco P., Constantini M., Dearden L.C., et al. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow// *Br. J. Haematol.* — 1988. — Vol. 68. — P. 401–403.
92. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. // *Stem Cells.* — 2001. — Vol. 19. — P. 180–192.
93. Bieback K., Kern S., Klüter H., Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood // *Stem cells.* — 2004. — Vol. 22. — P. 625–634.
94. Bielloch R., Wang Z., Meissner A., et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus // *Stem Cells.* — 2006. — Vol. 24. — P. 2007–2013.
95. Bisgaard H.C., Nagy P., Santoni-Rugiu E., et al. Proliferation, apoptosis, and induction of hepatic transcription factors are characteristics of the early response of biliary epithelial (oval) cells to chemical carcinogens // *Hepatology.* — 1996. — Vol. 23. — P. 62–70.
96. Bittner R.E., Schofer C., Weipoltshammer K., et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice // *Anat. Embryol. (Berl).* — 1999. — Vol. 199. — P. 391–396.
97. Bjerknes M., Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors // *Gastroenterology.* — 1999. — Vol. 116. — P. 7–14.
98. Bjorklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S., et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99, 4. — P. 2344–2349.
99. Bjornson C.R.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., et al. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo // *Science.* — 1999. — Vol. 283. — P. 534–537.
100. Black D., Lyman S., Heider T.R., et al. Molecular and cellular features of hepatic regeneration // *J. Surg. Res.* — 2004. — Vol. 117. — P. 306–315.
101. Blank T., Trendelenburg M., Kleinschmidt J. Reactivation of DNA replication in erythrocyte nuclei by *Xenopus* egg extract involves energy-dependent chromatin decondensation and changes in histone phosphorylation // *Exp. Cell. Res.* — 1992. — Vol. 202. — P. 224–232.
102. Blau H.M., Brazelton T.R., Weimann J.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? // *Cell.* — 2001. — Vol. 105. — P. 829–841.
103. Blau H.M., Chiu C.P., Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons // *Cell.* — 1983. — Vol. 32. — P. 1171–1180.
104. Blau H.M., Pavlath G.K., Hardeman E.C., et al. Plasticity of the differentiated state // *Science.* — 1985. — Vol. 230. — P. 758–766.

105. *Blau H.M., Springer M.L.* Muscle-mediated gene therapy // *N. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 333. — P. 1554–1556.
106. *Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // *Science.* — 1998. — Vol. 279. — P. 349–352.
107. *Boheler K.R., Czyz J., Tweedie D., et al.* Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes // *Circ Res.* — 2002. — Vol. 91,3. — P. 189–201.
108. *Boland G.M., Perkins G., Hall D., et al.* Wnt 3a promotes proliferation and supresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells // *J. Cell. Biochem.* — 2004. — Vol. 93, 6. — P. 1210–1230.
109. *Bonner-Weir S.* Beta cell turnover: its assessment and implications // *Diabetes.* — 2001. — Vol. 50, Supp 1. — P. 20–24.
110. *Bonner-Weir S., Sharma A.* Pancreatic stem cells // *J. Pathol.* — 2002. — Vol. 197. — P. 519–526.
111. *Bonnet D.* Haematopoietic stem cells // *J. Pathol.* — 2002. — Vol. 197. — P. 430–440.
112. *Bonyadi M., Waldman S.D., Liu D., et al.* Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1 /Ly 6A null mice // *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 5840–5845.
113. *Borue Y., Lee S., Grove L.* Bone marrow-derived cells contribute to epitheliac engraftment during wound healing // *Am. J. Patuol.* — 2004. — Vol. 165, 5. — P. 1767–1772.
114. *Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells // *Cell.* — 2005. — Vol. 122. — P. 947–956.
115. *Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., et al.* Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells // *Nature.* — 2006. — Vol. 441. — P. 349–353.
116. *Brandt J.E., Galy A.H., Luens K.M. et al.* Bone marrow repopulation by human marrow stem cells after longterm expansion culture on porcine endothelial cell line // *Exp. Hematol.* 1998. — Vol. 26. — P. 950–953.
117. *Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., et al.* From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice // *Science.* — 2000. — Vol. 290. — P. 1775–1779.
118. *Briggs R., King T.J.* Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1952. — Vol. 38. — P. 455–463.
119. *Brittan M., Braun K.M., Reynolds L.E., et al.* Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vitro with no evidence of sell cells // *J.Pathol.* — 2005. — Vol. 205. — P. 1–13.
120. *Brittan M., Wright N.A.* Gastrointestinal stem cells // *J. Pathol.* — 2002. — Vol. 197. — P. 492–509.
121. *Brockes J.P., Kumar A.* Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 3. — P. 566–574.
122. *Brons I.G., Smithers L.E., Trotter M.W., et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // *Nature.* — 2007. — Vol. 448. — P. 191–195.
123. *Brody J.S., Williams M.C.* Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation // *Ann. Rev. Physiol.* — 1992. — Vol. 54. — P. 351–371.
124. *Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E.* Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation // *J. Cell Biochem.* — 1997. — Vol. 64. — P. 278–294.
125. *Bruder S.P., Jaiswal N., Ricalton N.S., et al.* Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration // *Clin. Orthop. Rel. Res.* — 1998. — Vol. 355. — P. 247–256.
126. *Bruder S.P., Kurth A.A., Shea M., et al.* Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells // *J Orthop. Res.* — 1998. — Vol. 16. — P. 155–162.
127. *Bruder S.P., Ricalton N.S., Boynton R.E., et al.* Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation // *J. Bone and Mineral Research.* — 1998. — Vol. 13. — P. 655–663.
128. *Bruniquel D., Schwartz R.H.* Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process // *Nat. Immunol.* — 2003. — Vol. 4. — P. 235–240.

129. *Brustle O., Jones K.N., Learish R.D., et al.* Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants // *Science*. — 1999. — Vol. 285. — P. 754–756.
130. *Bucala R., Spiegel L.A., Chesney J., et al.* Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair // *Mol. Med.* — 1994. — Vol. 1. — P. 71–81.
131. *Cairns J.* Somatic stem cells and the kinetics of mutagenesis and carcinogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — Vol. 99. — P. 10567–10570.
132. *Camargo F.D., Finegold M., Goodell M.A.* Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 113. — P. 1266–1270.
133. *Camargo F.D., Green R., Copetenaki Y.* Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 1520–1527.
134. *Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow // *Blood*. — 2001. — Vol. 98. — P. 2396–2402.
135. *Caplan A.I.* The mesengenic process // *Clin. Plast. Surg.* — 1994. — Vol. 21. — P. 429–435.
136. *Caplan A.I.* Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine and fundamental research // *Conn. Tissue Res.* — 1995. — Vol. 31. — P. 9–14.
137. *Caplan A.I., Bruder S.P.* Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century // *Trends Mol. Med.* — 2001. — Vol. 7. — P. 259–264.
138. *Cartwright P., McLean C., Sheppard A., et al.* LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism // *Development*. — 2005. — Vol. 132. — P. 885–896.
139. *Castro R.F., Jackson K.A., Goodell M.A., et al.* Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo // *Science*. — 2002. — Vol. 297. — P. 1299.
140. *Campion D.R.* The muscle satellite cell: a review // *Int. Rev. Cytol.* — 1984. — Vol. 87. — P. 225–251.
141. *Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J., et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1 // *Nat. Med.* — 2004. — Vol. 10. — P. 858–864.
142. *Cerny J., Quesenberry P.J.* Chromatin remodeling and stem cell theory of relativity // *J. Cell Physiol.* — 2004. — Vol. 101. — P. 1–16.
143. *Chambers I., Colby D., Robertson M., et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell*. — 2003. — Vol. 113. — P. 643–655.
144. *Chambers I., Silva J., Colby D., et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development // *Nature*. — 2007. — Vol. 450. — P. 1230–1234.
145. *Cheng L., Hammond H., Ye Z., et al.* Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture // *Stem Cells*. — 2003. — Vol. 21. — P. 131–142.
146. *Cheng T., Rodrigues N., Shen H., et al.* Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21 // *Science*. — 2000. — Vol. 287. — P. 1804–1808.
147. *Chesney J., Bacher M., Bender A., et al.* The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naïve T cells in situ // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94, 12. — P. 6307–6312.
148. *Chiba S., Iwasaki Y., Sekino H., et al.* Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice // *Cell Transplant.* — 2003. — Vol. 12, 5. — P. 457–468.
149. *Chinzei R., Tanaka Y., Shimizu-Saito K., et al.* Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional Hepatocytes // *Hepatology*. — 2002. — Vol. 36. — P. 22–29.
150. *Chiu C-P., Dragowska W., Kim N.W., et al.* Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow // *Stem Cells*. — 1996. — Vol. 14. — P. 239–248.
151. *Choi D., Oh H.J., Chang U.J., et al.* In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into Hepatocytes // *Cell Transplant.* — 2002. — Vol. 11. — P. 359–368.

152. Choi J.B., Uchino H., Azuma K., et al. Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells // *Diabetologia*. — 2003. — Vol. 46. — P. 1366–1374.
153. Choi K. The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells // *J. Hematother. Stem Cell Res.* — 2002. — Vol. 11. — P. 91–101.
154. Chopp M., Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells // *Lancet Neurol.* — 2002. — Vol. 1. — P. 92–100.
155. Cibelli J.B., Grant K.A., Chapman K.B., et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates // *Science*. — 2002. — Vol. 295. — P. 819.
156. Clark B.P., Keating A. Biology of bone marrow stroma // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1995. — Vol. 770. — P. 70–76.
157. Clarke D., Frisen J. Differentiation potential of adult stem cells // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2001. — Vol. 11. — P. 575–580.
158. Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., et al. Generalized potential of adult neural stem cells // *Science*. — 2000. — Vol. 288. — P. 1660–1663.
159. Cogle C.R., Yachnis A.T., Laywell E.D., et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study // *Lancet*. — 2004. — Vol. 363. — P. 1432–1436.
160. Cohen M.M. The hedgehog signaling network // *Am. J. Med. Genet.* — 2003.. — Vol. 123A. — P. 5–28.
161. Collas P. Cytoplasmic control of nuclear assembly // *Reprod. Fertil. Dev.* — 1998. — Vol. 10. — P. 581–592.
162. Collas P. Nuclear reprogramming in cell-free extracts // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* — 2003. — Vol. 358. — P. 1389–1395.
163. Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M., et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97. — P. 3213–3218.
164. Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2001. — Vol. 98. — P. 7841–7845.
165. Colvin G.A., Lambert J.F., Abedi M., et al. Differentiation hotspots: the deterioration of hierarchy and stochasm // *Blood Cells. Mol. Dis.* — 2004. — Vol. 32. — P. 34–41.
166. Colvin G.A., Lambert J.F., Moore B.E., et al. Intrinsic hematopoietic stem cell/progenitor plasticity: inversions // *J Cell Physiol.* — 2004. — Vol. 199. — P. 20–31.
167. Condorelli G., Borello U., De Angelis L., et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001. — Vol. 98. — P. 10733–10738.
168. Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // *J. Cell. Physiol.* — 1999. — Vol. 181. — P. 67–73.
169. Cooke H.J., Smith B.A. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* — 1986. — Vol. 51. — P. 213–219.
170. Corbel S.Y., Lee A., Yi L., et al. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 1528–1532.
171. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells // *Science*. — 2005. — Vol. 309. — P. 1369–1373.
172. Cross M.A., Enver T. The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 1997. — Vol. 7. — P. 609–613.
173. Czyz J., Wobus A. Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors // *Differentiation*. — 2001. — Vol. 68. — P. 167–174.
174. Dabeva M.D., Hwang S.G., Vasa S.L. et al. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94. — P. 7356–7361.

175. Dabeva M.D., Petkov P.M., Sandhu J., et al. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver // *Am. J. Pathol.* — 2000. — Vol. 156. — P. 2017–2031.
176. Dahlke M.H., Popp F.C., Larsen S., et al. Stem cell therapy of the liver — fusion or fiction? // *Liver transplantation.* — 2004. — Vol. 10, 4. — P. 471–479.
177. Dao M.A., Nolta J.A. Use of the bnx/hu xenograft model of human hematopoiesis to optimize methods for retroviral-mediated stem cell transduction // *Int. J. Mol. Med.* — 1998. — Vol. 1. — P. 257–264.
178. Darr H., Benvenisty N. Factors involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells // *HEP.* — by eds.: A.M. Wobus & N. Boheler : Springer, 2006. — Vol. 174. — P. 1–19.
179. Davidson A.J., Ernst P., Wang Y., et al. Cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple hox genes // *Nature.* — 2003. — Vol. 425, 6955. — P. 300–306.
180. Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts // *Cell.* — 1987. — Vol. 51. — P. 987–1000.
181. Deans R.J., Moseley A.B. *Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses* // *Exp. Hematol.* — 2000. — Vol. 28. — P. 875–884.
182. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane // *Arthritis and Rheumatism.* — 2001. — Vol. 44. — P. 1928–1942.
183. De Boer J., Wang H.J., Van Blitterswijk C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells // *Tissue Eng.* — 2004. — Vol. 10. — P. 393–401.
184. Deng C., Zhang P., Harper J.W., et al. Mice lacking p21CIP1/ WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control // *Cell.* — 1995. — Vol. 82. — P. 675–684.
185. Deng W., Obrocka M., Fischer I., et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP // *Bioch. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — Vol. 282. — P. 148–152.
186. Dennis J.E., Merriam A., Awadallah A., et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse // *J. Bone Miner. Res.* — 1999. — Vol. 14. — P. 1–10.
187. Dennis J.E., Caplan A.I. Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow H-2K-tsA58 transgenic mouse // *J. Cell Physiol.* — 1996. — Vol. 167. — P. 523–538.
188. Dennis J.E., Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma // *Stem Cells.* — 2002. — Vol. 20. — P. 205–214.
189. Dennis J.E., Merriam A., Awadallah A., et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse // *J. Bone Miner. Res.* — 1999. — Vol. 14. — P. 700–709.
190. Deschaseaux F., Gindraux F., Saadi R., et al. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med, low phenotype // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 122. — P. 506–517.
191. De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A., et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow // *Cells Tissues Organs.* — 2003. — Vol. 174. — P. 101–109.
192. Deutsch G., Jung J., Zheng M., et al. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm // *Development.* — 2001. — Vol. 128. — P. 871–881.
193. Devine S.M., Bartholomew A.M., Mahmud N., et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion // *Exp. Hematol.* — 2001. — Vol. 29. — P. 244–255.
194. Devine M.J., Mierisch C.M., Jang E., et al. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model // *J. Orthop. Res.* — 2002. — Vol. 20. — P. 1232–1239.
195. Dexter T.M. Stromal cell associated haemopoiesis // *J. Cell. Physiol.* — 1982. — Vol. 1. — P. 87–94.
196. Dexter T.M., Wright E.G., Krizsa F., et al. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures // *Biomedicine.* — 1977. — Vol. 27. — P. 344–349.

197. *Diaz-Flores L., Gutierrez R., Lopez-Alonso A., et al.* Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis // *Clin Orthop Relat Res.* — 1992. — Vol. 275. — P. 280–286.
198. *Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., et al.* Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate // *Br. J. Haematol.* — 1999. — Vol. 107. — P. 275–281.
199. *Dimri G.P., Martinez J.L., Jacobs J.S., et al.* The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 4736–4745.
200. *Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli // *Blood.* — 2002. — Vol. 99. — P. 3838–3843.
201. *D'Ippolito G., Schiller P.C., Ricordi C., et al.* Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow // *J. Bone and Mineral Research.* — 1999. — Vol. 14. — P. 1115–1122.
202. *Do J.T., Scholer H.R.* Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells // *Stem cells.* — 2004. — Vol. 22. — P. 941–949.
203. *Doetschman T.C., Eistetter H., Katz M., et al.* The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium // *J. Embryol. Exp. Morphol.* — 1985. — Vol. 87. — P. 27–45.
204. *Doherty M.J., Ashton B.A., Walsh S.* Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo // *J. Bone Miner. Res.* — 1998. — Vol. 13. — P. 828–838.
205. *Doi M., Nagano A., Nakamura Y.* Molecular cloning and characterization of a novel gene, emilin-5, and its possible involvement in skeletal development // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — Vol. 313. — P. 888–893.
206. *Doitsidou M., Reichman-Fried M., Stebler J., et al.* Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1 // *Cell.* — 2002. — Vol. 111. — P. 647–659.
207. *Domen J., Weissman I.L.* Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate // *Molecular medicine today.* — 1999. — Vol. 5. — P. 201–208.
208. *Domen J., Wagers A., Weissman I.L.* Bone marrow (hematopoietic) stem cells // *Regenerative medicine.* — 2006. — Vol. 91, 1. — P. 13–28.
209. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* — 2006. — Vol. 8, 4. — P. 315–317.
210. *Dontu G., Al-Hajj M., Abdallah W.M., et al.* Stem cells in normal breast development and breast cancer // *Cell Prolif.* — 2003. — Vol. 36, 1. — P. 59–72.
211. *Dor Y., Brown J., Martinez O.I., et al.* Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation // *Nature.* — 2004. — Vol. 429, 6987. — P. 41–46.
212. *Doyonnas R., Blau H.M.* What is the future for stem cell research? Whether entity or function? // *Stem Cells Handbook.* — 2004. — Ed. by: Sell S.. — Humana Press Inc.. — Totowa, NJ. — Chapter 43. — P. 491–499.
213. *Drab M., Haller H., Bychkov R., et al.* From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model // *FASEB J.* — 1997. — Vol. 11. — P. 905–915.
214. *Dragoo J.L., Samimi B., Zhu M., et al.* Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads // *J. Bone and Joint Surg.* — 2003. — Vol. 85. — P. 740–747.
215. *Drukker M., Benvenisty N.* The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells // *Trends Biotechnol.* — 2004. — Vol. 22, 3. — P. 136–141.
216. *Drukker M., Katz G., Urbach A., et al.* Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99, 15. — P. 9864–9869.
217. *Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., et al.* Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation // *Cell.* — 1997. — Vol. 89. — P. 747–754.

218. Durcova-Hills G., Prelle K., Muller S., et al. Primary culture of porcine PGCs requires LIF and porcine membrane-bound stem cell factor // *Zigote*. — 1998. — Vol. 6. — P. 271–275.
219. Echeverri K., Tanaka E.M. Mechanisms of muscle dedifferentiation during regeneration // *Cell Dev. Biol.* — 2002. — Vol. 13. — P. 353–360.
220. Edelstein-Keshet L., Israel A., Lansdorp P. Modelling perspectives on aging: can mathematics help us stay young? // *J. Theor. Biol.* — 2001. — Vol. 213. — P. 509–525.
221. Efrat S. In: *Stem Cell and Gene-Based Therapy. Frontiers in regenerative medicine/* Eds. Battler A. & Leor J. // Springer. — 2006. — P. 301 — 308.
222. Eglitis M.A., Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94. — P. 4080–4085.
223. Eguchi G., Kodama R. Transdifferentiation // *Curr. Opin. Cell. Biol.* — 1993. — Vol. 5. — P. 1023–1028.
224. El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression // *Cell*. — 1993. — Vol. 75. — P. 817–825.
225. El-Navas A.M., Muchaneto-Kubara E.C., et al. Renal fibrosis: insights into pathogenesis and treatment // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 1997. — Vol. 29. — P. 55–62.
226. El-Navas A.M. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring // *Kidney Int.* — 2003. — Vol. 64. — P. 1553 — 1563.
227. Eminli S., Utikal J.S., Arnold K., et al. Reprogramming of neural progenitor cells into iPS cells in the absence of exogenous Sox2 expression // *Stem Cells*. — 2008. — Vol. 26. — P. 2467–2474.
228. Enelow R.I., Sullivan G.W., Carper H.T., et al. Induction of multinucleated giant cell formation from in vitro culture of human monocytes with interleukin-3 and interferon- γ : comparison with other stimulating factors // *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* — 1992. — Vol. 6. — P. 57–62.
229. Erickson G.R., Gimble J.M., Franklin D.M., et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2002. — Vol. 290. — P. 763–769.
230. Fagman H., Andersson L., Nilsson M. The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification budding, migration and lobulation // *Dev. Dynamics*. — 2006. — Vol. 235. — P. 444–455.
231. Faris R.A., Konkin T., Halpert G. Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease // *Artificial organs*. — 2001. — Vol. 25, 7. — P. 513–521.
232. Fehling H.J., Lacaud G., Kubo A., et al. Tracking mesoderm induction and its specialization to the hemangioblasts during ESC differentiation // *Differentiation*. — 2003. — Vol. 130. — P. 4217–4227.
233. Ferber S., Halkin A., Cohen H., et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia // *Nat Med.* — 2000. — Vol. 6. — P. 568–572.
234. Fernandez P.C., Frank S.R., Wang S.R., et al. Genomic targets of the human c-Myc protein // *Genes Dev.* — 2003. — Vol. 17. — P. 1115–1129.
235. Fernandes A., King L.C., Guz Y., et al. Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets // *Endocrinology*. — 1997. — Vol. 138. — P. 1750–1762.
236. Fernandes I.K.J.L., McKenzie I.A., Mill P., et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells // *Nat. Cell Biol.* — 2004. — Vol. 6, 11. — P. 1082–1093.
237. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors // *Science*. — 1998. — Vol. 279. — P. 1528–1530.
238. Fijnvandraat A.C., Lekanne Deprez R.H., Moorman A.F. Development of heart muscle-cell diversity: a help or hindrance for phenotyping embryonic stem cell-derived cardiomyocytes // *Cardiovasc Res.* — 2003. — Vol. 58, 2. — P. 303–312.
239. Fijnvandraat A.C., van Ginneken A.C., de Boer P.A., et al. Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube // *Cardiovasc. Res.* — 2003. — Vol. 58, 2. — P. 399–409.

240. *Florek M., Haase M., Marzesco A. M., et al.* Prominin-1 /CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer // *Cell Tissue Res.* — 2005. — Vol. 319. — P. 15–26.
241. *Fong H., Hohenstein K. A., Donovan P. J.* Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells // *Stem Cells.* — 2008. — Vol. 26, 8. — P. 1931–1938.
242. *Foster K. W., Liu Z., Nail C. D., et al.* Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia // *Oncogene.* — 2005. — Vol. 24. — P. 1491–1500.
243. *Friedenstein A. J.* Precursor cells of mechanocytes // *Int. Rev. Cytol.* — 1976. — Vol. 47. — P. 327–355.
244. *Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Gerasimov U. V.* Bone marrow osteogenic stem cells: In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers // *Cell Tissue Kinet.* — 1987. — Vol. 20. — P. 263–272.
245. *Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Lalykina K. S.* The development of fibroblast colonies in vjnj-layer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // *Cell. Tissue Kinet.* — 1970. — Vol. 3. — P. 393–403.
246. *Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Latsinik N. V., et al.* Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo // *Transplantation.* — 1974. — Vol. 17. — P. 331–340.
247. *Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N.* Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // *Exp. Hematol.* — 1976. — Vol. 4. — P. 267–274.
248. *Friedenstein A. J., Latzinik N. W., Grosheva A. G., et al.* Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges // *Exp. Hematol.* — 1982. — Vol. 10. — P. 217–227.
249. *Friedenstein A. J., Petrakova K. V., Kurolesova A. I., et al.* Heterotopic transplants of bone marrow: Analysis of precursor cells for osteogenic and haematopoietic tissues // *Transplantation.* — 1968. — Vol. 6. — P. 230–247.
250. *Friedenstein A. J., Piatetzky-Shapiro I. I., et al.* Osteogenesis in transplants of bone marrow cells // *J Embryol. Exp Morphol.* — 1966. — Vol. 16. — P. 381–390.
251. *Friedrich G., Soriano P.* Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice // *Genes Dev.* — 1991. — Vol. 5. — P. 1513.
252. *Fuchs E., Segre J. A.* Stem cells: a new lease on life // *Cell.* — 2000. — Vol. 100. — P. 143–155.
253. *Fujikura J., Yamato E., Yonemura S., et al.* Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors // *Genes Dev.* — 2002. — Vol. 16. — P. 784–789.
254. *Fukumoto T., Sperling J. W., Sanyal A., et al.* Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro // *Osteoarthritis Cartilage.* — 2003. — Vol. 11. — P. 55–64.
255. *Furusawa C., Kaneko K.* Theory of robustness of irreversible differentiation in a stem cell system: chaos hypothesis // *J. Theor. Biol.* — 2001. — Vol. 209. — P. 395–416.
256. *Gage F. H.* Mammalian neural stem cells // *Science.* — 2000. — Vol. 287. — P. 1433–1438.
257. *Gage F. H., Kempermann G., Palmer T. D., et al.* Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus // *J. Neurobiol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 249–266.
258. *Galli R., Binda E., Orfanelli U., et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma // *Cancer Res.* — 2004. — Vol. 64. — P. 7011–7021.
259. *Galli R., Borello U., Gritti A., et al.* Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells // *Nat. Neurosci.* — 2000. — Vol. 3. — P. 986–991.
260. *Galmiche M. C., Koteliansky V. E., Briere J., et al.* Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway // *Blood.* — 1993. — Vol. 82. — P. 66–76.

261. Galotto M., Campanile G., Robino G., et al. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo // *J. Bone Miner. Res.* — 1994. — Vol. 9. — P. 1239–1249.
262. Gao J., Dennis J.E., Solchaga L.A., et al. Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Tissue Eng.* — 2001. — Vol. 7. — P. 363–371.
263. Gardner R.L. Cellular basis of morphogenesis // *Ciba Found. Symp.* — 1989. — Vol. 144. — P. 8048–8052.
264. Garlanda C., Dejana E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1997. — Vol. 17. — P. 1193–1202.
265. Garrington T.P., Ishizuka T., Papst P.J., et al. MEKK2 gene disruption causes loss of cytokine production in response to IgE and c-Kit ligand stimulation of ES cell-derived mast cells // *EMBO J.* — 2000. — Vol. 19. — P. 5387–5395.
266. Gat U., Dasgupta R., Degenstein L., Fuchs E. De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated β -catenin in skin // *Cell.* — 1998. — Vol. 95. — P. 605–614.
267. Gaustad K. G., Boquest A. C., Anderson B. E., et al. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes // *Bioch. Biophys. Res. Com.* — 2004. — Vol. 314. — P. 420–427.
268. Geiger H., Sick S., Bonifer C., et al. Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts // *Cell.* — 1998. — Vol. 93. — P. 1055–1065.
269. Genbacev O., Krtolica A., Zdravkovic T., et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders // *Fertil. and Steril.* — 2005. — Vol. 83, 5. — P. 1517–1529.
270. Ghaffari S., Dougherty G.J., Eaves A. C., Eaves C.J. Diverse effects of anti-CD44 antibodies on the stromal cell-mediated support of normal but not leukaemic (CML) haemopoiesis in vitro // *Br. J. Haematol.* — 1997. — Vol. 97. — P. 22–28.
271. Goldberg M., Smith A.J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* — 2004. — Vol. 15, 1. — P. 13 — 27.
272. Goodell M.A. Stem-cell ‘plasticity’: befuddled by the muddle // *Curr. Opin. Hematol.* — 2003. — Vol. 10. — P. 208–213.
273. Goolsby J., Marty M. C., Heletz D., et al. Hematopoietic progenitors express neural genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 14926–14931.
274. Grafi G. How cells dedifferentiate: a lesson from plants // *Develop. Biology.* — 2004. — Vol. 268. — P. 1–6.
275. Grant M.B., May W.S., Caballero S., et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization // *Nat. Med.* — 2002. — Vol. 8. — P. 607–612.
276. Grenier G., Rudnicki M.A. The Potential Use of Myogenic Stem Cells in Regenerative Medicine // *Stem Cells. Handbook of Experimental Pharmacology* / Eds.: Wobus A.M., Boheler K.R. — Springer-Verlag. — 2006. — Vol. 174. — P. 299–317.
277. Grewal S.I., Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression // *Science.* — 2003. — Vol. 301. — P. 798–802.
278. Grisham J.W., Thorgeirsson S.S. Liver stem cells // *Am. J. Pathol.* — 1993. — Vol. 142,5. — P. 1331–1333.
279. Grompe M., d’Andrea A. Fanconi anemia and DNA repair // *Hum. Mol. Genet.* — 2001. — Vol. 10. — P. 2253–2259.
280. Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells // *J. Cell. Physiol.* — 2001. — Vol. 189. — P. 54–63.

281. *Gronthos S., Simmons P.J.* The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro // *Blood*. — 1995. — Vol. 85. — P. 929–940.
282. *Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J., et al.* Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow // *J. Cell Sci.* — 2003. — Vol. 116. — P. 1827–1835.
283. *Grove J.E., Bruscia E., Krause D.S.* Plasticity of bone marrow-derived stem cells // *Stem cells*. — 2004. — Vol. 22. — P. 487–500.
284. *Guan K., Nayernia K., Maier L.S., et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis // *Nature*. — 2006. — Vol. 440. — P. 1199–1203.
285. *Gurdon J.B., Byrne J.A.* The first half-century of nuclear transplantation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 8048–8052.
286. *Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D., et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation // *Nature*. — 1999. — Vol. 401. — P. 390–394.
287. *Hakelien A-M., Gaustad K.G., Collas P.* Transient alteration of cell fate using a nuclear and cytoplasmic extract of an insulinoma cell line // *Bioch. Bioph. Res. Com.* — 2004. — Vol. 316. — P. 834–841.
288. *Hakelien A-M., Landsverk H.B., Robl J.M.* Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts // *Nature Biotechnol.* — 2002. — Vol. 20. — P. 460–466.
289. *Hamazaki T., Iiboshi Y., Oka M., et al.* Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro // *FEBS Lett.* — 2001. — Vol. 497. — P. 15–19.
290. *Han Y.M., Kang Y.K., Koo D.B., et al.* Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro // *Theriogenology*. — 2003. — Vol. 59. — P. 33–44.
291. *Hanada K., Dennis J.E., Caplan A.I.* Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *J. Bone Miner. Res.* — 1997. — Vol. 12. — P. 1606–1616.
292. *Handgretinger R., Gordon P.R., Leimig T., et al.* Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2003. — Vol. 996. — P. 141–151.
293. *Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency // *Cell*. — 2008. — Vol. 133. — P. 250–264.
294. *Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin // *Science*. — 2007. — Vol. 318. — P. 1920–1923.
295. *Harder F., Kirchhof N., Petrovic S., et al.* Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts // *Exp. Hematol.* — 2004. — Vol. 32, 7. — P. 673–682.
296. *Hardy K.H., Handyside A.H., Winston R.M.L.* The human blastocyst: cell number death and allocations during late preimplantation development // *Development*. — 1989. — Vol. 107. — P. 597–604.
297. *Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W.* Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // *Nature*. — 1990. — Vol. 345. — P. 458–460.
298. *Harris R.G., Herzog E.L., Bruscia E.M., et al.* Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia // *Science*. — 2004. — Vol. 305. — P. 90–93.
299. *Harris H., Watkins J.F., Campbell G.L., et al.* Mitosisin hybrid cells derived from mouse and man // *Nature*. — 1965. — Vol. 207. — P. 606–608.
300. *Harvey M., Sands A.T., Weiss R.S., et al.* In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice // *Oncogene*. — 1993. — Vol. 8. — P. 2457–2467.
301. *Hassink R.J., Dowell J.D., Brutel de la Riviere A., et al.* Stem cell therapy for ischemic heart disease // *Trends Mol. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 436–441.
302. *Hatano S.Y., Tada M., Kimura H., et al.* Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity // *Mech. Dev.* — 2005. — Vol. 122. — P. 67–79.
303. *Hatch H.M., Zheng D., Jorgensen M.L., et al.* SDF-1 α /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats // *Cloning stem cells*. — 2002. — Vol. 4. — P. 339–351.

304. Hawkins N., Garriga G. Asymmetric cell division: from A to Z. // *Genes Dev.* — 1998. — Vol. 12. — P. 3625–3638.
305. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* — 1961. — Vol. 25. — P. 585–621.
306. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies // *Bone.* — 1992. — Vol. 13. — P. 69–80.
307. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 // *J. Cell Physiol.* — 1996. — Vol. 166. — P. 585–592.
308. He J.Q., Ma Y., Lee Y., et al. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiomyocytes: action potential characterization // *Circ. Res.* — 2003. — Vol. 93, 1. — P. 32–39.
309. Helgason C.D., Sauvageau G., Lawrence H.J., et al. Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro // *Blood.* — 1996. — Vol. 87. — P. 2740–2749.
310. Hellstrom M., Kalén M., Lindahl P., et al. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse // *Development.* — 1999. — Vol. 126. — P. 3047–3055.
311. Hemann M.T., Strong M.A., Hao L.Y., et al. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability // *Cell.* — 2001. — Vol. 107. — P. 67–77.
312. Henle E.S., Han Z., Tang N., et al. Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274. — P. 962–971.
313. Hennighausen L., Robinson G.W. Signaling pathways in mammary gland development. // *Dev. Cell.* — 2001. — Vol. 1. — P. 467–475.
314. Henningson C.T., Stanislaus M.A., Gewirtz A., et al. Embryonic and adult stem therapy // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2003. — Vol. 111, 2. — P. 745–753.
315. Henson J.D., Neumann A.A., Yeager T.R., et al. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells // *Oncogene.* — 2002. — Vol. 21. — P. 598–610.
316. Hess D., Li L., Martin M., et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration // *Nat. Biotechnol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 763–770.
317. Hiiragi T., Solter D. Reprogramming is essential in nuclear transfer // *Mol. Reprod. Dev.* — 2005. — Vol. 70. — P. 417–421.
318. Hirschi K.K., Goodell M.A. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells // *Gene Ther.* — 2002. — Vol. 9. — P. 648–652.
319. Hirschmann-Jak C., Foster A.E., et al. A distinct «side population» of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 14228–14232.
320. Hiyama K., Hirai Y., Kyoizumi S., et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells // *J. Immunol.* — 1995. — Vol. 155. — P. 3711–3715.
321. Hochedinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — Vol. 349. — P. 275–286.
322. Hochedinger K., Jamada Y., Beard C., et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues // *Cell.* — 2005. — Vol. 121. — P. 465–477.
323. Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer // *Nature.* — 2001. — Vol. 411. — P. 366–374.
324. Hole N., Graham G.J., Menzel U., et al. A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonal stem cell differentiation in vitro // *Blood.* — 1996. — Vol. 88, 4. — P. 1266–1276.
325. Hofstetter C.P., Schwarz E.J., Hess D., et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99. — P. 2199–2204.

326. Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta // *Nature Medicine*. — 1999. — Vol. 5. — P. 309–313.
327. Horwitz E., Le B.K., Dominici M., et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. — 2005. — Vol. 7. — P. 393–395.
328. Hovatta O., Mikkola M., Gertow K., et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allow production of human embryonic stem cells // *Human reproduction*. — 2003. — Vol. 18, 7. — P. 1404–1409.
329. Hough S.R., Clements I., Welch P.J., et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of Oct4 and Nanog // *Stem Cells*. — 2006. — Vol. 24. — P. 1467–1475.
330. Hu E., Tontonoz P., Spiegelman B.M. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and c/EBP β // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1995. — Vol. 92. — P. 9856–9860.
331. Huang S., Law P., Young D., et al. Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs. adult bone marrow and mobilized peripheral blood // *Exp. Hematology*. — 1998. — Vol. 27. — P. 1162–1171.
332. Humphrey R.K., Beattie G.M., Lopez A.D., et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent // *Stem Cells*. — 2004. — Vol. 22. — P. 522–530.
333. Hung S.C., Chen N.J., Hsieh S.L., et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow // *Stem Cells*. — 2002. — Vol. 20. — P. 249–258.
334. Hwang W.S., Lee B.C., Lee C.K., Kang S.K. Human embryonic stem cells and therapeutic cloning // *J. Vet. Sci*. — 2005. — Vol. 6, 2. — P. 87–96.
335. Janus A., Holz G.G., Theise N.D., et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion // *J Clin Invest*. — 2003. — Vol. 111. — P. 843–850.
336. Ilancheran S., Michalska A., Peh G., et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential // *Biol.Reprod*. — 2007. — Vol. 77. — P. 577–588.
337. In't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-vander Keur C., et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation // *Blood*. — 2003. — Vol. 102. — P. 1548–1549.
338. In't Anker P.S., Scherjon S.A., et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta // *Stem Cells*. — 2004. — Vol. 22. — P. 1338–1345.
339. International Stem Cell initiative, Adewumi O., Aflatoonian B., et al. // *Nat. Biotechnol*. — 2007. — Vol. 25, 7. — P. 803–816.
340. Ishida T., Inaba M., Hisha H., et al. Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation // *J. Immunol*. — 1994. — Vol. 152. — P. 3119–3124.
341. Ishikawa F., Drake C.J., Yang S., et al. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. — 2003. — Vol. 996. — P. 174–185.
342. Ishizaka S., Shiroy A., Konda S., et al. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3 β gene // *FASEB J*. — 2002. — Vol. 16. — P. 1444–1446.
343. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers // *Mol Med*. — 2000. — Vol. 6, 2. — P. 88–95.
344. Ivanova N., Dobrin R., Lu R., et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference // *Nature*. — 2006. — Vol. 442. — P. 533–538.
345. Jackson K.A., Majka S.M., Wang H., et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells // *J. Clin. invest*. — 2001. — Vol. 107. — P. 1395–1402.

346. Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — Vol. 96. — P. 14482–14486.
347. Jaenisch R. Human cloning — the science and ethics of nuclear transplantation // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 351. — P. 2787–2791.
348. Jaenisch R., Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals // *Nat. Genet.* — 2003. — Vol. 33, Suppl. 1 — P. 245–254.
349. Jaiswal N., Bruder S.P. Human osteoblastic cells secrete paracrine factors which regulate differentiation of osteogenic precursors in marrow // *Trans. Orthop. Res. Soc.* — 1997. — Vol. 22. — P. 524–534.
350. Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., et al. Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro // *J. Cell. Biochem.* — 1997. — Vol. 64. — P. 295–312.
351. Jang Y.Y., Sharkis S.J. Metamorphosis from bone marrow derived primitive stem cells to functional liver cells // *Cell Cycle.* — 2004. — Vol. 3. — P. 980–982.
352. Jang Y.Y., Collector M.I., Baylin S.B., et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion // *Nat. Cell Biol.* — 2004. — Vol. 6. — P. 532–539.
353. Jankowski R.J., Deasy B.M., Huard J. Muscle-derived stem cells // *Gene Therapy.* — 2002. — Vol. 9. — P. 642–647.
354. Javazon E.H., Beggs K.J., Flake A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging // *Exp. Hematol.* — 2004. — Vol. 32. — P. 414–425.
355. Jensen U.B., Lowell S., Watt F.M. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis // *Development.* — 1999. — Vol. 126. — P. 2409–2418.
356. Jenuwein T.A., Allis C.D. Translating the histone code // *Science.* — 2001. — Vol. 293. — P. 1074–1080.
357. Jeong J.A., Hong S.H., Gang E.J., et al. Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray // *Stem Cells.* — 2005. — Vol. 23. — P. 584–593.
358. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // *Nature.* — 2002. — Vol. 418. — P. 41–49.
359. Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain // *Exp. Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 896–904.
360. Jiang S., Walker L., Afentoulis M., et al. Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 16891–16896.
361. Johe K.K., Hazel T.G., Muller T., et al. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system // *Genes Dev.* — 1996. — Vol. 10. — P. 3129–3140.
362. Johnson B.V., Shindo N., Rathjen P.D., et al. Understanding pluripotency — how embryonic stem cells keep their options open // *Mol. Hum. Reprod.* — 2008. — Vol. 14, 9. — P. 513–520.
363. Jones E.A., Kinsey S.E., English A., et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells // *Arthritis & Rheumatism.* — 2002. — Vol. 46, 12. — P. 3349–3360.
364. Jones P.L., Wolffe A.P. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression // *Semin. Cancer Biol.* — 1999. — Vol. 9. — P. 339–347.
365. Jones P.H., Harper S., Watt F.M. Stem cell patterning and fate in human epidermis // *Cell.* — 1995. — Vol. 80. — P. 83–93.
366. Kadereit S., Deeds L.S., Haynesworth S.E. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer // *Stem Cells.* — 2002. — Vol. 20. — P. 573–582.
367. Kadiyala S., Young R.G., Thiede M.A., et al. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro // *Cell Transplant.* — 1997. — Vol. 6. — P. 125–134.

368. Kahn A.J., Simmons D.J. Chondrocyte-to-osteocyte transformation in grafts of perichondrium-free epiphyseal cartilage // Clin. Orthop. Rel. Res. — 1977. — Vol. 129. — P. 299–304.
369. Kakinuma S., Tanaka Y., Chinzei R., et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells // Stem Cells. — 2003. — Vol. 21. — P. 217–227.
370. Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis // Cell. — 2004. — Vol. 119. — P. 1001–1012.
371. Kania G., Blyszczuk P., Czyz J., et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic and hepatic cells // Methods in Enzymology. — 2003. — Vol. 365. — P. 287–303.
372. Kataoka K., Medina R.J., Kageyama T., et al. Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin // Am. J. Pathol. — 2003. — Vol. 163. — P. 1227–1231.
373. Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S., et al. Cell surgace and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal cells // Stem cells. — 2005. — Vol. 23. — P. 412–423.
374. Kaufman D.S., Hanson E.T., Lewis R.L., et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 98,19. — P. 10716–10721.
375. Kawamoto A., Gwon H.C., Iwaguro H., et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia // Circulation. — 2001. — Vol. 103. — P. 634–637.
376. Kawasaki H., Mizuseki K., Sasai Y. Selective neural induction from ES cells by stromal cell-derived inducing activity and its potential therapeutic application in Parkinson's disease // Methods Mol. Biol. — 2000. — Vol. 185. — P. 217–227.
377. Kayahara T., Sawada R., Takaishi S., et al. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine // FEBS Lett. — 2003. — Vol. 535. — P. 131–135.
378. Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Jiang Y., et al. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos // Cell Transpl. — 2003. — Vol. 12. — P. 201–213.
379. Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 108, 3. — P. 407–414.
380. Kennedy L.J., Weissman I.J. Dual origin of intimal cells in cardiac-allograft arteriosclerosis // N. Engl. J. Med. — 1971. — Vol. 285. — P. 884–886.
381. Kim B.J., Seo J.H., Bubien J.K., Oh Y.S. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro // Neuroreport. — 2002. — Vol. 13. — P. 1185–1188.
382. Kim J., Chu J., Shen X., et al. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells // Cell. — 2008. — Vol. 132. — P. 1049–1061.
383. Kim C.H., Broxmeyer H.E. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment // Blood. — 1998. — Vol. 91. — P. 100–110.
384. Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E., et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer // Cell. — 2005. — Vol. 121. — P. 823–835.
385. Kinoshita T., Sekiguchi T., Xu M.J., et al. Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. — 1999. — Vol. 96. — P. 7265–7270.
386. Kinoshita K., Ura H., Akagi T., et al. GABPalpha regulates Oct-3/4 expression in mouse embryonic stem cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2007. — Vol. 353. — P. 686–691.
387. Klimanskaya I., Chung Y., Becker S., et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres // Nature. — 2006. — Vol. 444. — P. 481–485.
388. Klug M.G., Soonpaa M.H., Koh G.Y., et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts // J. Clin. Invest. — 1996. — Vol. 98. — P. 216–224.

389. *Klyushnenkova E., Mosca J.D., McIntosh R.R.* Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro: implications for allogeneic transplantation // *Blood*. — 1998. — Vol. 92. — P. 642–645.
390. *Knoblich J.A.* Mechanisms of asymmetric cell division during animal development // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1997. — Vol. 9. — P. 833 — 841.
391. *Ko S. Y., Kang H. Y., Lee H. S., et al.* Identification of *Jmjd1a* as a STAT3 downstream gene in mES cells // *Cell Struct. Funct.* — 2006. — Vol. 31. — P. 53–62.
392. *Kobayashi T., Hamano K., Li T. S., et al.* Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model // *J. Surg. Research*. — 2000. — Vol. 89. — P. 189–195.
393. *Koc O.N., Lasarus H.N.* Mesenchymal stem cell: heading into the clinic // *Bone Marrow Transplant*. — 2001. — Vol. 27. — P. 235 — 239.
394. *Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolos M.J.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow–derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function // *Nat. Med.* — 2001. — Vol. 7. — P. 430–436.
395. *Kodama S., Kühtreiber W., Fujimura S., et al.* Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice // *Science*. — 2003. — Vol. 302. — P. 1223–1227.
396. *Kogler G., Sensken S., Airey J.A., et al.* A new human somatic stemcell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential // *J Exp Med*. — 2004. — Vol. 200. — P. 123–135.
397. *Kohyama J., Abe H., Shimazaki T., et al.* Brain from bone: efficient «meta-differentiation» of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent // *Differentiation*. — 2001. — Vol. 68. — P. 235–244.
398. *Kollet O., Shvitiel S., Chen Y.Q., et al.* HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver // *J. Clin. Invest*. — 2003. — Vol. 112. — P. 160–169.
399. *Kondo T., Raff M.* Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells // *Science*. — 2000. — Vol. 289. — P. 1754–1757.
400. *Kopen G. C., Prockop D.J., Phinney D.G.* Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96. — P. 10711–10716.
401. *Korbling M., Katz R.L., Khanna A., et al.* Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral blood stem cells // *N. Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 346. — P. 738–746.
402. *Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I., et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell // *Cell*. — 2001. — Vol. 105. — P. 369–377.
403. *Krakovski M.L., Kritzik M.R., Jone E.M., et al.* Pancreatic expression of keratinocyte growth factor leads to differentiation of islet hepatocytes and proliferation of duct cells // *Am. J. Pathol.* — 1999. — Vol. 154. — P. 683–691.
404. *Krebsbach P.H., Mankani M.M., Satomuro K., et al.* Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells // *Transplantation*. — 1998. — Vol. 66. — P. 1272–1278.
405. *Krebsbach P.H., Kuznetsov S.A., Satomura K., et al.* Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts // *Transplantation*. — 1997. — Vol. 63. — P. 1059–1065.
406. *Kritzik M.R., Sarvetnick N.* Pancreatic stem cells // In: *Stem cell Biology*. Eds: Marshak DR. et al. — Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. — P. 499–513.
407. *Kuai Y.L., Cong X.Q., Li X.L., et al.* Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells // *Liver Transpl.* — 2003. — Vol. 9. — P. 1094–1099.
408. *Kubo M., Nakamura M., Tasaki A., et al.* Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer // *Cancer Res*. — 2004. — Vol. 64. — P. 6071–6074.
409. *Kucia M., Dawn B., Hunt G., et al.* Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction // *Circ. Res*. — 2004. — Vol. 95. — P. 1191–1199.

410. Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous-That is the question // *Exp. Hematol.* — 2005. — Vol. 33. — P. 613–623.
411. Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Bone marrow as a source of circulating CXCR4(+) tissue-committed stem cells // *Biol Cell.* — 2005. — Vol. 97. — P. 133–146.
412. Kucia M., Ratajczak J., Reza R., et al. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury // *Blood Cells Mol. Dis.* — 2004. — Vol. 32. — P. 52–57.
413. Kuroiwa T., Kakishita E., Hamano T., et al. Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function // *J.Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 107. — P. 1365–1373.
414. Kuznetsov S.A., Krebsbach P.H., Satomura K., et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo // *J. Bone Min. Res.*-1997. — Vol. 12. — P. 1335–1347.
415. Kuznetsov S.A., Friedenstein A.J., Robey P.G. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro // *Br. J. Haematol.* — 1997. — Vol. 97. — P. 561–570.
416. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S., et al. Circulating skeletal stem cells // *J. Cell Biol.* — 2001. — Vol. 153. — P. 1133–1140.
417. Kuroda T., Tada M., Kubota H., et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression // *Mol Cell Biol.* — 2005. — Vol. 25. — P. 2475–2485.
418. Kyba M., Perlingeiro R.C., Daley G.Q. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors // *Cell.* — 2002. — Vol. 109, N.1. — P. 29–37.
419. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo // *Nat. Med.*-2000. — Vol. 6. — P. 1229–1234.
420. Lajtha L.G. Stem cell concepts // *Differentiation.* — 1979. — Vol. 14. — P. 23–34.
421. Lako M., Armstrong L., Cairns P.M., et al. Hair follicle dermal cells repopulate the mouse hematopoietic system // *J. Cell Sci.* — 2002. — Vol. 115. — P. 3967–3974.
422. Landsverk H.B., Hakelien A.M., Kuntziger T., et al. Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract // *EMBO Rep.* — 2002. — Vol. 3. — P. 384–389.
423. Lansdorp P.M. The telomere checkpoint // *Hematology.* — 2002. — Vol. 1. — P. 369–376.
424. Lansdorp P.M., Dragowska W., Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells // *J. Exp. Med.* — 1993. — Vol. 178. — P. 787–795.
425. Lansdorp P.M. Self renewal of stem cells // *Biol Blood Marrow Transplant.* — 1997. — Vol. 3. — P. 171–178.
426. Lansdorp P.M., Verwoerd N.P., van de Rijke F.M., et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes // *Hum Mol Genet.* — 1996. — Vol. 5. — P. 685–691.
427. Lanza R.P., Cibelli J.B., Blackwell C., et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells // *Science.* — 2000. — Vol. 288. — P. 665–669.
428. Lanza R.P., Cibelli J.B., West M.D. Human therapeutic cloning // *Nat. Med.* — 1999. — Vol. 5. — P. 975–977.
429. Lapidot T., Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice // *Leukemia.* — 2002. — Vol. 16. — P. 1992–2003.
430. Lattanzi L., Salvatori G., Coletta M., et al. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 101. — P. 2119–2128.
431. Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L., et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use // *Bone Marrow Transplant.* — 1995. — Vol. 16. — P. 557–564.

432. *Leary A. G., Ogawa M., Strauss L. C., et al.* Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes // *J. Clin. Invest.* — 1984. — Vol. 74. — P. 2193–2197.
433. *Le Blanc K.* Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells.// *Cytherapy*. — 2003. — Vol. 5. — P. 485–489.
434. *Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells // *Lancet.* — 2004. — Vol. 363. — P. 1439–1441.
435. *Le Douarin N.M., Dupin E.* Cell lineage analysis in neural crest ontogeny // *J. Neurobiol.* — 1993. — Vol. 24. — P. 146–161.
436. *Lee K. D., Kyo T.K-Ch, Whang-Peng J., et al.* In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells // *Hepatology.* — 2004. — Vol. 40. — P. 1275–1284.
437. *Lee O.K., Kyo T.K., Chen W.M., et al.* Isolation of multi-potent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood // *Blood.* — 2004. — Vol. 103. — P. 1669–1675.
438. *Lee S.H., Lumelsky N., Studer L., et al.* Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 18. — P. 675–679.
439. *Lee V.M., Stoffel M.* Bone marrow: An extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cells? // *J Clin Invest.* — 2003. — Vol. 111. — P. 799–801.
440. *Leedham S.J., Brittan M., McDonald S.A., et al.* Intestinal stem cells // *J. Cell Mol.Med.* — 2005. — Vol. 9, 1. — P. 11–24.
441. *Lemischka I.A.* Few thoughts about the plasticity of stem cells // *Exp Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 848–852.
442. *Lemieux M.E., Eavans C.J.* Identification of properties that can distinguish primitive populations of stromal-cell-responsive lympho-myeloid cells from cells that are stromal-cell-responsive but lymphoid-restricted and cells that have lympho-myeloid potential but are also capable of competitively repopulating myeloablated recipients // *Blood.* — 1996. — Vol. 88. — P. 1639–1648.
443. *Lennon D. P., Haynesworth S.E., Bruder S. P., et al.* Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum for optimal selection and proliferation // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* — 1996. — Vol. 32. — P. 602–611.
444. *Lerou P.H., Daley G. Q.* Therapeutic potential of embryonic stem cells // *Blood Reviews.* — 2005. — Vol. 30. — P. 1–11.
445. *Levenberg S., Golub J.S., Amit M., et al.* Endothelial cells derived from human embryonic stem cells // *Proc Natl Acad Sci USA* .-2002. — Vol. 99, 7. — P. 4391–4396.
446. *Levenberg S., Huang N.F., Lavik E., et al.* Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimenshional polimer scaffolds // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 12741–12746.
447. *Levesque J.B., Takamatsu Y., Nilsson S.K., et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic cell mobilization by granulocyte colony// *Blood.* — 2001. — Vol. 98. — P. 1289–1290.
448. *Lewis R.* Debate over stem cell origin continues // *Scientist.* — 2002. — Vol. 16. — P. 1–5.
449. *Lewis M. T., Veltmaat J.M.* Next stop the twilight zone: hedgehog network regulation of mammary gland development // *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia.* — 2004. — Vol. 9. — P. 165–181.
450. *Li J., Wang G., Wang C., et al.* MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal // *Differentiation.* — 2007. — Vol. 75. — P. 299–307.
451. *Li J.Y., Pu M.T., Hirasawa R., et al.* Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog // *Mol. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 27. — P. 8748–8759.
452. *Li W., Wel W., Zhu S., et al.* Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors // *Cell Stem Cell.* — 2009. — Vol. 4. — P. 16–19.

453. Li Y., Chopp M., Chen J., et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2000. — Vol. 20. — P. 1311–1319.
454. Liang L., Bickenbach J.R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development // *Stem Cells.* — 2002. — Vol. 20. — P. 21–31.
455. Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F., et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate sitespecific differentiation after in utero transplantation in sheep // *Nat. Med.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1282–1286.
456. Lin G., Finger E., Gutierrez-Ramos J.C. Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous ctlls in fetal and adult mouse tissues // *Eur. J. Immunol.* — 1995. — Vol. 25. — P. 1508–1516.
457. Ling V., Neben S. In vitro differentiation of embryonic stem cells: Immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies // *J. Cell. Physiol.* — 1997. — Vol. 171. — P. 104–115.
458. Liu B.Y., McDermott S.P., Khwaja S.S., et al. The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 4158–4163.
459. Liu S-R., Liu H-Q., Pan Y-Q., et al. Human embryonic germ cells isolation from early stages of post-implantation embryos // *Cell Tissue Res.* — 2004. — Vol. 318. — P. 525–531.
460. Liu S., Dontu G., Wisha M. Mammary stem cells, self-renewal pathways and carcinogenesis// *Breast cancer research.* — 2005. — Vol. 7, 3. — P. 86–95.
461. Lodie T.A., Blickarz C.E., Devarakonda T.J., et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction // *Tissue Eng.* — 2002. — Vol. 8. — P. 739–751.
462. Loeffler M., Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, selforganization and models — a conceptual approach // *Cells Tissues Organs.* — 2002. — Vol. 171. — P. 8–26.
463. Loeffler M., Roeder I. Conceptual models to understand tissue stem cell organization // *Curr. Opin. Hematol.* — 2004. — Vol. 11. — P. 81–87.
464. Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells // *Nat. Genet.* — 2006. — Vol. 38. — P. 431–440.
465. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — Vol. 105. — P. 2883–2888.
466. Lu L., Shen R.-N., Broxmeyer H.E. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application // *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* — 1996. — Vol. 22. — P. 61–78.
467. Lumelsky N., Blondel O., Laeng P., et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets // *Science.* — 2001. — Vol. 292. — P. 1389–1394.
468. Ma L.A., Sturniolo M., Schiltz R.L., et al. A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program // *Embo J.* — 2001. — Vol. 20. — P. 1739.
469. Mackenzie T.C., Flake A.W. Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep // *Blood Cells Mol. Dis.* — 2001. — Vol. 27. — P. 601–604.
470. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., et al. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell.* — 2008. — Vol. 3. — P. 340–345.
471. Maherali N., Hochedlinger K. Tgfb signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc // *Curr. Biol.* — 2009. — Vol. 19. — P. 1718–1723.
472. Maherali N., Sridharan R., Xie W., et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodelling and widespread tissue contribution // *Cell Stem Cell.* — 2007. — Vol. 1. — P. 55–70.

473. Mai Q., Yu Y., Li T., et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts // *Cell Res.* — 2007. — Vol. 17. — P. 1008–1019.
474. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D., et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // *J. Biomed. Sci.* — 2003. — Vol. 10. — P. 228–241.
475. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells// *J. Cell Physiol.* — 1998. — Vol. 176. — P. 57–66.
476. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro // *J. Clin. Invest.* — 1999. — Vol. 103. — P. 697–705.
477. Malhi H., Irani A.N., Gagandeep S., Gupta S. Isolation of human progenitor liver stem cells// *J. Cell Sci.* — 2002. — Vol. 115. — P. 2679–2688.
478. Mali P., Ye Z., Hommond H.H., et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts// *Stem Cells.* — 2008. — Vol. 26,8. — P. 1998–2005.
479. Maltsev V.A., Wobus A.M., Rohwedel J., et al. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents // *Circ. Res.* — 1994. — Vol. 75, N.2. — P. 233–244.
480. Marley S.B., Lewis J.L., Gordon M.Y. Progenitor cells divide symmetrically to generate new colony-forming cells and clonal heterogeneity // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 121. — P. 643–648.
481. Marson A., Foreman R., Chevalier B., et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency// *Cell Stem Cell.* — 2008. — Vol. 3. — P. 132–135.
482. Martin-Rendon E., Watt S.M. Exploitation of stem cell plasticity // *Transfus. Med.* — 2003. — Vol. 13. — P. 325 — 349.
483. Martins S.B., Eide T., Steen R.L., et al. HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope // *J. Cell Sci.* — 2000. — Vol. 113. — P. 3703–3713.
484. Mason R.J., Williams M.C., Moses H.L., et al. Stem cells in lung development, disease and therapy // *Am.J.Respir. Cell Mol.Biol.* — 1997. — Vol. 16. — P. 355–363.
485. Masuya M., Drake C., Fleming P., et al. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells// *Blood.* — 2003. — Vol. 101. — P. 2215 — 2218.
486. Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells // *EMBO J.* — 1999. — Vol. 18. — P. 4261–4269.
487. Matsui Y., Zsebo K., Hogan B.L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture // *Cell.* — 1992. — Vol. 70. — P. 841–847.
488. Matsumoto R., Omura T., Yoshiyama M., et al. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. Vol. 25, 6. — P. 1168–1173.
489. Maves L., Schubiger G. Transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: a model for understanding pluripotency and selector gene maintenance // *Curr Opin. Genet. Dev.* — 2003. — Vol. 13. — P. 472–479.
490. McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M., et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Dev. Cell.* — 2004. — Vol. 6. — P. 483–495.
491. McDonald J.W., Becker D., Holekamp T.F., et al. Repair of the injured spinal cord and the potential of embryonic stem cell transplantation // *J. Neurotrauma.* — 2004. — Vol. 21, 4. — P. 383–393.
492. McDonald J.W., Liu X.Z., Qu Y., et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord // *Nat. Med.* — 1999. — Vol. 5. — P. 1410–1412.
493. McKay R. Stem cells in the central nervous system // *Science.* — 1997. — Vol. 276. — P. 66–71.
494. McKay R. Stem cells — hype and hope // *Nature.* — 2000. — Vol. 406. — P. 361–364.

495. McKinney-Freeman S.L., Jackson K.A., Camargo F.D., et al. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99. — P. 1341–1346.
496. Medvinsky A.L., Samoylina N.L., Müller A.M., et al. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse // *Nature.* — 1993. — Vol. 364. — P. 64–67.
497. Meirelles Lda S., Nardi N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 123. — P. 702–711.
498. Menthena A., Deb N., Oertel M., et al. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver // *Stem cells.* — 2004. — Vol. 22. — P. 1049–1061.
499. Merok J.R., Sherley J.L. Breaching the kinetic barrier to in vitro somatic stem cell propagation // *J. Biomed. Biotech.* — 2001. — Vol. 1. — P. 24–26.
500. Meshorer E., Yellajoshula D., George E., et al. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells // *Dev. Cell* — 2006. — Vol. 10. — P. 105–116.
501. Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation // *Blood.* — 1998. — Vol. 92. — P. 345–347.
502. Metz T., Verdonk G. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells // *Mech. Ageing Dev.* — 1981. — Vol. 16. — P. 81–89.
503. Mezey E., Key S., et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 1364–1369.
504. Mezey E., Chandross K., Harta G., et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow // *Science.* — 2000. — Vol. 290. — P. 1779–1782.
505. Migashita H., Suzuki A., Fukao K., et al. Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells in vitro // *Cell Transplant.* — 2002. — Vol. 11. — P. 429–434.
506. Mikkelsen E., Ku M., Jaffe D.B., et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells // *Nature.* — 2007. — Vol. 448. — P. 553–560.
507. Milhem M., Mahmud N., Lavelle D., et al. Modification of hematopoietic stem cell fate by 5-aza 2-deoxycytidine and trichostatin A // *Blood.* — 2004. — Vol. 103. — P. 4102–4110.
508. Miller R.A., Ruddle F.H. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids // *Cell.* — 1976. — Vol. 9. — P. 45–55.
509. Min J.Y., Yang Y., Converso K.L., et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats // *J. Appl. Physiol.* — 2002. — Vol. 92, 1. — P. 288 — 296.
510. Minguell J.J., Erices A., Conget P. Mesenchymal stem cells // *Exp Biol. Med (Maywood).* — 2001. — Vol. 226. — P. 507–520.
511. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells // *Cell.* — 2003. — Vol. 113. — P. 631–642.
512. Mohle R., Bautz F., Rafii S., et al. Regulation of transeendothelial migration of hematopoietic progenitor cells // *Ann. N.Y.Acad. Sci.* — 1999. — Vol. 872. — P. 176–186.
513. Molofsky A.V., Pardoll R., Iwashita T., et al. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation // *Nature.* — 2003. — Vol. 425. — P. 962–967.
514. Monk M., Boubelik M., Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development // *Development* — 1987. — Vol. 99. — P. 371–382.
515. Moolten F.L., Bucher N.L. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation // *Science.* — 1967. — Vol. 158. — P. 272–274.
516. Morrison S.J., Uchida N., Weissman I.L. The biology of hematopoietic stem cells // *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* — 1995. — Vol. 11. — P. 35–71.
517. Morrison S.J. Stem cell potential: Can anything make anything? // *Curr. Biol.* — 2001. — Vol. 11. — P. 7–9.
518. Morshead C.M., Benviste P., Iscove N.N., et al. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations // *Nature Med.* — 2002. — Vol. 8. — P. 268–273.

519. *Morshead C.M., Reynolds B.A., Craig C.G., et al.* Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells // *Neuron*. — 1994. — Vol. 13. — P. 1071–1082.
520. *Mosca J.D., Hendricks J.K., Buyaner D., et al.* Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery // *Clin. Orthop. Rel. Res.* — 2000. — Vol. 379. — P. 71–79.
521. *Moscoso I., Centeno A., Lopez E., et al.* Differentiation «in vitro» of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc* — 2005. — Vol. 37. — P. 481–482.
522. *Moshiri A., Close J., Reh T.A.* Retinal stem cells and regeneration // *Int. J. Dev. Biol.* — 2004. — Vol. 48. — P. 1003–1014.
523. *Muguruma Y., Reyes M., Nakamura Y., et al.* In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells // *Exp. Hematol.* — 2003. — Vol. 31. — P. 1323–1330.
524. *Muller A.M., Dzierzak E.A.* ES cells have only a limited lymphopoietic potential after adoptive transfer into mouse recipients // *Development*. — 1993. — Vol. 118, 4. — P. 1343–1351.
525. *Muller M., Fleischmann B.K., Selbert S., et al.* Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro // *Faseb J.* — 2000. — Vol. 14. — P. 2540–2548.
526. *Mumm J.S., Kopan R.* Notch signaling: from the outside in // *Dev. Biol.* — 2000. — Vol. 228. — P. 151–165.
527. *Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., et al.* Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells // *Circulation*. — 2003. — Vol. 107. — P. 2733–2740.
528. *Muraglia A., Cancedda R., Quarto R., et al.* Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model // *J. Cell Sci.* — 2000. — Vol. 113. — P. 1161–1166.
529. *Murphy J.M., Dixon K., Beck S. et al.* Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis // *Arthritis Rheumatism*. — 2002. — Vol. 46. — P. 704–713.
530. *Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts // *Nature Biotechnol.* — 2008. — Vol. 26. — P. 101–106.
531. *Nakahara H., Bruder S.P., Goldberg V.M., et al.* In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum // *Clin. Orthop. Relat. Res.* — 1991. — Vol. 259. — P. 223–234.
532. *Nakatake Y., Fukui N., Iwamatsu Y., et al.* KLF4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells // *Mol. Cell. Biol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 7772–7782.
533. *Nardi N.B., Meirelles L.S.* Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization // *HEP*. — Springer-Verlag Berlin Heidelberg. — 2006. — Vol. 174. — P. 249–282.
534. *Nathan S., Das De S., Thambyah A., et al.* Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue // *Tissue Eng.* — 2003. — Vol. 9. — P. 733–744.
535. *Newsome P.N., Johannessen I., Boyle S., et al.* Human cord blood derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion // *Gastroenterology*. — 2003. — Vol. 124. — P. 1891–1900.
536. *Ng W.A., Doetschman T., Robbins J., et al.* Muscle isoactin expression during in vitro differentiation of murine embryonic stem cells // *Pediatr. Res.* — 1997. — Vol. 41. — P. 285–292.
537. *Nichols J., Zevnik B., Anastasiadis K.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 // *Cell*. — 1998. — Vol. 95. — P. 379–391.
538. *Nilsson S., Dooner M., Weier H., et al.* Cells capable of bone production engraft from whole bone marrow transplants in nonablated mice // *J. Exp. Med.* — 1999. — Vol. 189. — P. 729–34.
539. *Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A., et al.* The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2 // *Mol. Cell Biol.* — 1999. — Vol. 19. — P. 5453–5465.

540. Niwa H., Miyazaki J., Smith A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, de-differentiation or self-renewal of ES cells // *Nat. Genet.* — 2000. — Vol. 24. — P. 372–376.
541. Nolte J., Dao M., Wells S., et al. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93. — P. 2414–2419.
542. Noort W.A., Kruisselbrink A.B., In't Anker P.S., et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice // *Exp. Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 870–878.
543. Noth U., Osyczka A.M., Tul, R., et al. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells // *J. Orthop. Res.* — 2002. — Vol. 20. — P. 1060–1069.
544. Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations // *Science.* — 1976. — Vol. 194. — P. 23–28.
545. Odelberg S.J., Kollhoff A., Keating M.T. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx 1* // *Cell.* — 2000. — Vol. 103. — P. 1099–1109.
546. Odelberg S.J. Inducing cellular dedifferentiation: a potential method for enhancing endogenous regeneration in mammals // *Semin. Cell Dev. Biol.* — 2002. — Vol. 13. — P. 335–343.
547. O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., et al. C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // *Nature.* — 2005. — Vol. 435. — P. 839–843.
548. Odorico J.A., Kaufman D.S., Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines // *Stem Cells.* — 2000. — Vol. 19, 3. — P. 193–204.
549. Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D., et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 12313–12318.
550. Oh S.H., Muzzonigro T.M., Bae S.H., et al. Adult bone marrow derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes // *Lab. Invest.* — 2004. — Vol. 84, 5. — P. 607–617.
551. Oh S.K., Kim H.S., Park YB., et al. Methods for expansion of human embryonic stem cells // *Stem Cells.* — 2005. — Vol. 23. — P. 605–609.
552. Ohgushi H., Caplan A.I. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering // *J. Biomed. Mater. Res.* — 1999. — Vol. 48. — P. 913–927.
553. Oikawa S., Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening // *FEBS Lett.* — 1999. — Vol. 453. — P. 365–368.
554. Okabe M., Ikawa M., Kominami K., et al. «Green mice» as a source of ubiquitous green cells // *FEBS Lett.* — 1997. — Vol. 407. — P. 313–316.
555. Okamoto R., Yajima T., Yamazaki M., et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract // *Nature Med.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1011–1017.
556. Okano M., Xie S., Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA(cytosine-5) methyltransferases // *Nat. Genet.* — 1998. — Vol. 19. — P. 219–220.
557. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka, S. Generation of germline competent induced pluripotent stem cells // *Nature.* — 2007. — Vol. 448. — P. 313–317.
558. Olmsted-Davis E.A., Gugala Z., Camargo F., et al. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 15877–15882.
559. Olsen B.R., Reginato A.M., Wang W. Bone development // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 2000. — Vol. 16. — P. 191–220.
560. O'Neill A., Schaffer D.V. The biology and engineering of stem cell control // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2004. — Vol. 40. — P. 5–16.
561. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — Vol. 98. — P. 10344–10349.

562. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // *Nature*. — 2001. — Vol. 410. — P. 701–705.
563. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2001. — Vol. 938. — P. 221–229.
564. Otani A., Kinder K., Ewalt K., et al. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis // *Nature Med.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1004–1010.
565. Owen M. Marrow stromal stem cells // *J. Cell Sci. Suppl.* — 1988. — Vol. 10. — P. 63–76.
566. Owen M.E., Cave J., Joyner C.J. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F // *J. Cell Sci.* — 1987. — Vol. 87. — P. 731–738.
567. Owen M.E., Friedenstein A.J. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors // *Ciba Found. Symp.* — 1988. — Vol. 136. — P. 42–60.
568. Ozawa C.R., Springer M.L., Blau H.M. A novel means of drug delivery^ myoblast-mediated gene therapy and regulatable retroviral vectors // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2000. — Vol. 40. — P. 295–317.
569. Pahal G.S., Jauniaux E., Kinnou C., et al. Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks gestation // *Am. J. Obstet. Gynaecol.* — 2000. — Vol. 183. — P. 1029–1034.
570. Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R., et al. Fibroblast growth factor 2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS // *J. Neurosci.* — 1999. — Vol. 19. — P. 8487–8497.
571. Panepucci R.A., Siufi J.L., Silva W.A. Jr., et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. — 2004. — Vol. 22. — P. 1263–1278.
572. Park I.K., He Y., Lin F., et al. Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells // *Blood*. — 2002. — Vol. 99. — P. 488–498.
573. Park I.H., Zhao R., West J.A., et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors // *Nature*. — 2008. — Vol. 451. — P. 141–146.
574. Park Y.B., Kim Y.Y., Oh S.K., et al. Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture // *Exp. Mol. Med.* — 2008. — Vol. 40. — P. 98–108.
575. Parwaresch M.R., Kreipe H., Radzun H.J. Human macrophage hybrid forming spontaneous giant cells // *Virchows Arch.* — 1986. — B51. — P. 89–96.
576. Pasca di Magliano M., Di Lauro R., Zannini M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97. — P. 13144–13149.
577. Patapoutian A., Wold B.J., Wagner R.A. Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle // *Science*. — 1995. — Vol. 270. — P. 1818–1821.
578. Peled A., Petit I., Kollet O., et al. Dependence of human stem cells engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CxCR4 // *Science*. — 1999. — Vol. 283. — P. 845–847.
579. Peled A., Zipori D., Abramsky O., et al. Expression of alpha-smooth muscle actin in murine bone marrow stromal cells // *Blood*. — 1991. — Vol. 78. — P. 304–309.
580. Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., et al. p63 identifies keratinocyte stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2001. — Vol. 98. — P. 3156–3161.
581. Pellegrini G., Golisano O., Paterna P., et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface // *J. Cell Biol.* — 1999. — Vol. 145. — P. 769–782.
582. Pera M.F. Embryonic stem cells // *Hematology*. — 2002. — Vol. 1. — P. 369–373.
583. Pera M.F., Cooper S., Mills J., et al. Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells // *Differentiation*. — 1989. — Vol. 42. — P. 10–23.
584. Pera M.F., Reubinoff B., Trounson A. Human embryonic stem cells // *J. Cell Sci.* — 2000. — Vol. 113. — P. 5–10.

585. *Pereira R. F., Halford K. W., O'Hara M. D., et al.* Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 4857–4861.
586. *Pereira R. F., O'Hara M. D., Laptev A. V., et al.* Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — Vol. 95. — P. 1142–1147.
587. *Pereira C. F., Terranova R., Ryan N. K., et al.* Heterokaryon-based reprogramming of human B-lymphocytes for pluripotency requires Oct4, but not Sox2 // *Plos.Genet.* — 2008. — Vol. 4. — e1000170. — P. 1–14.
588. *Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells // *Science.* — 1999. — Vol. 284. — P. 1168–1170.
589. *Petersen B. E., Grossbard B., Hatch H., et al.* Mouse Ab-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers // *Hepatology.* — 2003. — Vol. 37. — P. 632–640.
590. *Phillips B. W., Hentze H., Rust W. L., et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage // *Stem cells and development.* — 2007. — Vol. 16, 4. — P. 63–78.
591. *Phillips R. L., Ernst R. E., Brunk B., et al.* The genetic program of hematopoietic stem cells // *Science.* — 2000. — Vol. 288. — P. 1635–1640.
592. *Phinney D. G., Kopen G., Righter W., et al.* Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells // *J. Cell. Biochem.* — 1999. — Vol. 75. — P. 424–436.
593. *Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* — 1999. — Vol. 284. — P. 143–147.
594. *Pittenger M. F., Marshak D. R.* Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow // eds by D. R. Marshak, R. L. Gardner, D. Gottlieb. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Stem cell Biology.* — 2001. — P. 349–373.
595. *Pituch-Noworolska A., Majka M., Janowska-Wieczorek A., et al.* Circulating CXCR4⁺ stem/progenitor cells compete for SDF-1⁺ niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cells plasticity // *Folia Histochem. Cytobiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 13–21.
596. *Planat-Benard V., Silvestre J. S., Cousin B., et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109. — P. 656–663.
597. *Potocnik A. J., Kohler H., Eichmann K.* Hematolymphoid in vivo reconstitution potential of subpopulations derived from in vitro differentiated embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94. — P. 10295–10300.
598. *Potten C. S., Morris R. J.* Epithelial stem cells in vivo // *J. Cell Sci.* — 1988. — Vol. 10. — P. 45–62.
599. *Preston S. L., Alison M. R., Forbes S. J., et al.* The new stem cell biology: something for everyone. // *Mol. Patol.* — 2003. — Vol. 56. — P. 86–96.
600. *Prockop D. J.* Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues // *Science.* — 1997. — Vol. 276. — P. 71–74.
601. *Qi H., Aguiar D. J., Williams S. M., et al.* Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 3305–3310.
602. *Qi X., Li T. G., Hao J., et al.* BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 6027–6032.
603. *Quarto R., Thomas D., Liang C. T.* Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity // *Calcif. Tissue Int.* — 1995. — Vol. 56. — P. 123–129.
604. *Quesenberry P. J., Becker P. S.* Stem cell homing: Rolling, crawling, and nesting // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — Vol. 95. — P. 15155–15157.

605. *Quesenberry P.J., Colvin G.A.* The chiaroscuro stem cell: unified stem cell theory // *Blood*. — 2002. — Vol. 100. — P. 4266–4271.
606. *Quesenberry P.J., Dooner G., Colvin G., et al.* Stem cell biology and the plasticity polemic// *Exp. Hematology*. — 2005. — Vol. 33. — P. 389–394.
607. *Quesenberry P., Habibian H., Dooner M., et al.* Physical and Physiological Plasticity of Hematopoietic Stem Cells// *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. — 2001. — Vol. 27. — P. 934–937.
608. *Quesenberry P.J., Stewart M.F., Peters S., et al.* Engraftment of hematopoietic stem cells in non-myeloablated and myeloablated hosts // *Stem Cells*. — 1997. — Vol. 15. — P. 167–170.
609. *Quirici N., Soligo D., Bossolasco P., et al.* Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies // *Exp. Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 783–791.
610. *Quito F.L., Beh J., Bashayan O., et al.* Effects of fibroblast growth factor-4 (k-FGF) on long-term cultures of human bone marrow cells // *Blood*. — 1996. — Vol. 87. — P. 1282–1291.
611. *Raffi S.* Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 105. — P. 17–19.
612. *Raffi S., Mohle R., Shapiro F., et al.* Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium // *Leuk. Lymphoma*. — 1997. — Vol. 27. — P. 375–386.
613. *Ramalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y., et al.* «Stemness»: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells // *Science*. — 2002. — Vol. 298. — P. 597–600.
614. *Rambhatla L., Chiu C.P., Kundu P., et al.* Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells // *Cell Transplant.* — 2003. — Vol. 12, 1. — P. 1–11.
615. *Rao M.S., Dwivedi R.S., Yeldandi A.* Role of periductular and ductular epithelial cells of the adult rat pancreas in pancreatic hepatocyte lineage // *Am. J. Pathol.* — 1989. — Vol. 134. — P. 1069–1086.
616. *Rao M.C., Reddy J.K.* Hepatic transdifferentiation in the pancreas // *Semin. Cell Biol.* — 1995. — Vol. 6. — P. 151–156.
617. *Rao M.S., Yeldandi A.N., Reddy J.K.* Stem cell potential of ductular and periductular cells in the adult rat pancreas // *Cell Differ.* — 1990. — Vol. 29. — P. 155–163.
618. *Rao M.S., Yukawa M., Omori M., et al.* Expression of transcription factors and stem cell factor precedes hepatocyte differentiation in rat pancreas // *Gene Expression*. — 1996. — Vol. 6. — P. 15–22.
619. *Rao M.S., Reddy M.K., Reddy J.K.* Respons of chemically induced hepatocytelike cells in hamster pancreas to methyl clofenapate, a peroxisome proliferator// *J.Cell Biol.* 1982. — Vol. 95. — P. 50–56.
620. *Rao M.S., Dwivedi R.S., Subbarao V., et al.* Almost total conversion of pancreas to liver in the adult rat: a reliable model to study transdifferentiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1988. — Vol. 156. — P. 131–136.
621. *Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R., et al.* Heterogeneous populations of bone marrow stem cells — are we spotting on the same cells from the different angles? // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2004. — Vol. 3. — P. 139–146.
622. *Ratajczak M.Z., Majka M., Kucia M., et al.* Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles// *Stem Cells*. — 2003. — Vol. 21. — P. 363–371.
623. *Razin A., Shemer R.* DNA methylation in early development // *Hum. Mol. Genet.* 1995. — Vol. 4. — P. 1751–1755.
624. *Reddy J.K., Sambasiva Rao M., Yeldandi A.V., et al.* Pancreatic hepatocytes an in vivo model for cell lineage in pancreas of adult rat // *Dig. Dis. Sci.* — 1991. — Vol. 36, 4. — P. 502–509.
625. *Reik W., Dean W., Walter J.* Epigenetic reprogramming in mammalian development // *Science*. — 2001. — Vol. 293. — P. 1089–1093.

626. Reiser J., Zhang X.Y., Hemenway C.S., et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases // *Exp. Opin. Biol. Therap.* — 2005. — Vol. 5. P. 1571–1578.
627. Reitze R.L., Valcanis H., Brooker G.F., et al. Purification of pluripotent neuronal stem cell from the adult mouse brain // *Nature*. — 2001. — Vol. 412. — P. 736–739.
628. Reubinoff B.E., Itsykson P., Turetsky T., et al. Neural progenitor from human embryonic stem cells // *Nat Biotechnol.* — 2001. — Vol. 19, 12. — P. 1134–1140.
629. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro // *Nat. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 18, 4. — P. 399–404.
630. Reya T., Duncan A.W., Ailles L., et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells // *Nature*. — 2003. — Vol. 423. — P. 409–414.
631. Reyes M., Lund T., Lenvik T., et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells // *Blood*. — 2001. — Vol. 98. — P. 2615–2625.
632. Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow // *J. Clin. Invest.* — 2002. — Vol. 109. — P. 337–346.
633. Reyes M., Verfaillie C.M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells // *Ann. NY Acad. Sci.* — 2001. — Vol. 938. — P. 231–233.
634. Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system // *Science*. — 1992. — Vol. 255. — P. 1707–1710.
635. Rheinwald J.C., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells // *Cell*. — 1975. — Vol. 6. — P. 331–343.
636. Richards M., Huibregtse B.A., Caplan A.I., et al. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during disfraction // *J. Orthop. Res.* — 1999. — Vol. 17. — P. 900–908.
637. Rickard D.J., Kassem M., Hefferan T., et al. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow // *J Bone Miner Res.* — 1996. — Vol. 11. — P. 312–320.
638. Roche E., Ensenat-Waser R., Reig J.A., et al. Therapeutic potential of stem cells in diabetes // *Stem cells. Handbook of Experimental Pharmacology/ Ed. Wobus AM., Boheler KR. Springer-Verlas.* 2006. — Vol. 174. — P. 147–167.
639. Rodic N., Rutenberg M.S., Terada N. Cell fusion and reprogramming: resolving our transdifferences // *Trends in Molecular Medicine*. — 2004. — Vol. 10, 3. — P. 93–96.
640. Roeder I., Loeffler M. A novel dynamic model of hematopoietic stem cell organization based on the concept of within-tissue plasticity // *Exp. Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 853–861.
641. Roeder I., Loeffler M., Quesenberry P.J., et al. Quantitative tissue stem cell modeling // *Blood*. — 2003. — Vol. 102. — P. 1143–1144.
642. Roelen B.A., Dijke P. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFbeta family members // *J. Orthop. Sci.* — 2003. — Vol. 8. — P. 740–748.
643. Rolink A., Natt S., Melchers F., et al. Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors // *Nature*. — 1999. — Vol. 401. — P. 603–606.
644. Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., Smirnov V.N., et al. Searching for alternative sources of post-natal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord // *Stem Cells*. — 2003. — Vol. 21. — P. 105–110.
645. Rombouts W.J., Ploemacher R. E. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture // *Leukemia*. — 2003. — Vol. 17. — P. 160–170.
646. Romer J.T., Kimura H., Magdaleno S., et al. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1+/- p53-/- mice // *Cancer Cell*. — 2004. — Vol. 6. — P. 229–240.
647. Romieu-Mourez R., Francis M., Boivin M.N., et al. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-γ, TGF-β and cell density // *J. Immunol.* — 2007. — Vol. 179. — P. 1549–1558.

648. Ross S.E., Hemati N., Longo K.A., et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling // *Science*. — 2000. — Vol. 289. — P. 950–953.
649. Rowland B.D., Bernards R., Peeper D.S. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene // *Nat. Cell Biol.* — 2005. — Vol. 7. — P. 1074–1082.
650. Rowland B.D., Peeper D.S. KLF4, p21 find context-dependent opposing forces in cancer // *Nat. Rev. Cancer*. — 2006. — Vol. 6. — P. 11–23.
651. Rudy-Rail D., Lough J. Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in mouse ESC // *Circ. Res.* — 2004. — Vol. 94. — P. 107–114.
652. Rufer N., Brummendorf T.H., Chapuis B., et al. Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the first year following stem cell transplantation // *Blood*. — 2001. — Vol. 97. — P. 575–577.
653. Rufer N., Dragowska W., Thornbury G., et al. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry // *Mol. Biotechnol.* — 1998. — Vol. 16. — P. 743–747.
654. Ruscelli F.N., Dubois C.M., Jacobsen S.E., et al. Transforming growth factor β and interleukin-1: a paradigm for opposing regulation of haemopoiesis // *Baillieres Clin. Haematol.* — 1992. — Vol. 5. — P. 703–708.
655. Sabatini F., Petecchia L., Tavian M., et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities // *Lab. Invest.* — 2005. — Vol. 85. — P. 962–971.
656. Saito T., Dennis J.E., Lennon D.P., et al. Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice in vitro // *Tissue Eng.* — 1995. — Vol. 4. — P. 327–343.
657. Sales K.M., Salacinski H.J., Alobaid N., et al. Advancing vascular tissue engineering: the role of stem cell technology // *TRENDS in Biotechnology*. — 2005. — Vol. 23, 9. — P. 461–467.
658. Sanchez-Ramos J.R., Song S., Cardozo A.A., et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro // *Exp. Neurol.* — 2000. — Vol. 164. — P. 247–256.
659. Sanchez-Ramos J. R. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood // *J. Neurosci. Res.* — 2002. — Vol. 69. — P. 880–893.
660. Sandgren E.P., Palmiter R.D., Heckel J.L., et al. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene // *Cell*. — 1991. — Vol. 66. — P. 245–256.
661. Sarugaser R., Lickorish D., Baksh D., et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors // *Stem Cells*. — 2005. — Vol. 23, N. 2. — P. 220–229.
662. Sata M., Saiura A., Kunisato A., et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis // *Nat. Med.* — 2002. — Vol. 8. — P. 403–409.
663. Sato N., Sanjuan I.M., Heke M., et al. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse // *Dev Biol.* — 2003. — Vol. 260. — P. 404–413.
664. Sauvageau G., Thorsteinsdottir U., Eaves C.J. et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo // *Genes Dev.* — 1995. — Vol. 9. — P. 1752–1765.
665. Schiller P.C., D'Ippolito G., Brambilla R., et al. Inhibition of gap-junctional communication induces the trans-differentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 14133–14138.
666. Schioppa T., Uranchimeg B., Saccani A., et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia // *J. Exp. Med.* — 2003. — Vol. 198. — P. 1391–1402.
667. Schuldiner M., Eiges R., Eden A., et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells // *Brain Res.* — 2001. — Vol. 913, 2. — P. 107–114.
668. Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J., et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97. — P. 11307–11312.

669. *Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L., et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells // *J. Clin. Invest.* — 2002. — Vol. 109. — P. 1291–1302.
670. *Sell S.* Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells // *Hepatology.* — 2001. — Vol. 33. — P. 738–750.
671. *Serov O., Matveeva N., Kuznetsov S., et al.* Embryonic hybrid cells: a powerful tool for studying pluripotency and reprogramming of the differentiated cell chromosomes // *An. Acad. Bras. Cienc.* — 2001. — Vol. 73, 4. — P. 561–568.
672. *Serra V., vonZglinicki T.* Human fibroblasts in vitro senesce with a donor-specific telomere length // *FEBS Lett.* — 2002. — Vol. 516. — P. 71–74.
673. *Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A., et al.* Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects // *Ann. Thorac. Surg.* — 2002. — Vol. 73. — P. 1919–1926.
674. *Shamblott M.J., Axelman J., Littlefield J.W., et al.* Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — Vol. 98. — P. 113–118.
675. *Shamblott M.J., Axelman J., Wang J., et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — Vol. 95. — P. 13726–13731.
676. *Shefer G., Wleklinski-Lee M., Yablonka-Reuveni Z.* Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway // *J. Cell Sci.* — 2004. — Vol. 117. — P. 5393–5404.
677. *Shen C.N., Slack J.M.W., Tosh D.* Molecular basis of transtransdifferentiation of pancreas to liver // *Nat. Cell Biol.* — 2000. — Vol. 2. — P. 879–887.
678. *Sherley J.L.* Guanine nucleotide biosynthesis is regulated by the cellular p53 concentration // *J. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 266. — P. 24815–24828.
679. *Sherley J.L.* Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture // *Stem Cells.* — 2002. — Vol. 20. — P. 561–572.
680. *Sherley J.L., Stadler P.B., Johnson D.R.* Expression of the wild-type p53 antioncogene induces guanine nucleotide-dependent stem cell division kinetics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 136–140.
681. *Sherley J.L., Stadler P.B., Stadler J.S.* A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells // *Cell Prolif.* — 1995. — Vol. 28. — P. 137–144.
682. *Sherwood R.I., Christensen J.L., Weissman I.L., Wagers A.J.* Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells // *Stem Cells.* — 2004. — Vol. 22, 7. — P. 1292–1304.
683. *Shi Q., Rafii S., Wu M.H., et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells // *Blood.* — 1998. — Vol. 92. — P. 362–367.
684. *Shih C.C., Weng Y., Mamelak A., et al.* Identification of a candidate human neurohematopoietic stem cell population // *Blood.* — 2001. — Vol. 98. — P. 2412–2422.
685. *Shihabuddin L.S., Horner P.J., Ray J., Gage F.H.* Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus // *J. Neurosci.* — 2000. — Vol. 20. — P. 8727–8735.
686. *Shiojiri N., Lemire L.M., Fausto N.* Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development // *Canc. Res.* — 1991. — Vol. 51. — P. 2611–2620.
687. *Shiroti A., Yoshikawa M., Yokota H.* Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone // *Stem Cells.* — 2002. — Vol. 20, 4. — P. 284–292.
688. *Sillaber C., Walchshofer S., Mosberger I., et al.* Immunophenotypic characterization of human bone marrow endosteal cells // *Tissue Antigens.* — 1999. — Vol. 53. — P. 559–568.
689. *Silva J., Chambers I., Pollard S., Smith A.* Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion // *Nature.* — 2006. — Vol. 441. — P. 997–1001.

690. Silva W.A. Jr., Covas D.T., Panepucci R.A., et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. — 2003. — Vol. 21. — P. 661–669.
691. Simmons P.J., Gronthos S., Zannettino A., et al. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis // *Prog. Clin. Biol. Res.* — 1994. — Vol. 389. — P. 271–279.
692. Simmons P.J., Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1 // *Blood*. — 1991. — Vol. 78. — P. 55–62.
693. Singh S.K., Clarke I.D., Hide T., et al. Cancer stem cells in nervous system tumors // *Oncogene*. — 2004. — Vol. 23. — P. 7267–7273.
694. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., et al. Identification of human brain tumour initiating cells // *Nature*. — 2004. — Vol. 432. — P. 396–401.
695. Slack J.M.W. Homeotic transformations in man: implication for the mechanism of embryonic development and for the organization of epithelia // *J. Theor. Biol.* — 1985. — Vol. 114. — P. 463–490.
696. Slack J.M.W., Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia — switching cell types // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2001. — Vol. 11. — P. 581–586.
697. Slagboom P.E., Droog S., Boomsma D.I. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups // *Am. J. Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 55. — P. 876–882.
698. Smith A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men // *Annu Rev Cell Dev Biol.* — 2001. — Vol. 17. — P. 435–462.
699. Smith J.R., Pochampally R., Perry A., et al. Isolation of a Highly Clonogenic and Multipotential Subfraction of Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma // *Stem Cells*. — 2004. — Vol. 22. — P. 823–831.
700. Solchaga L.A., Gao J., Dennis J.E., et al. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle // *Tissue Engineering*. — 2002. — Vol. 8. — P. 333–347.
701. Song L., Tuan R.S. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow // *FASEB J.* — 2004. — Vol. 18. — P. 980–982.
702. Soria B., Roche E., Berna G., et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice // *Diabetes*. — 2000. — Vol. 49. — P. 157–162.
703. Soria B., Roche E., Berna G., et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice // *Diabetes*. — 2000. — Vol. 50. — P. 521–533.
704. Soriano J.V., Uyttendaele H., Kitajewski J., et al. Expression of an activated Notch4(int-3) oncoprotein disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in mammary epithelial cells in vitro // *Int J Cancer*. — 2000. — Vol. 86. — P. 652–659.
705. Sottile V., Halleux C., Bassilana F., et al. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells // *Bone*. — 2002. — Vol. 30. — P. 699–704.
706. Sottile V., Thomson A., McWhir J. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells // *Cloning Stem Cells*. — 2003. — Vol. 5, 2. — P. 149–155.
707. Sperger J.M., Chen X., Draper J.S., et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 13350–13355.
708. Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. Stem cells find their niche // *Nature*. — 2001. — Vol. 414. — P. 98–104.
709. Srivatsa B., Srivatsa S., Johnson K.L., et al. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case control study // *Lancet*. — 2001. — Vol. 358. — P. 2034–2038.
710. Stadtfeld M., Brennand K., Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic β cells into induced pluripotent stem cells // *Curr. Biol.* — 2008. — Vol. 18. — P. 890–894.

711. Stadtfeld M., Maherali N., Breault D. T., et al. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse // *Cell Stem Cell*. — 2008. — Vol. 2. — P. 230–240.
712. Strelchenko N., Verlinsky O., Kukharensky V., et al. Morula-derived human embryonic stem cells // *Reprod. Biomed. Online*. — 2004. — Vol. 9. — P. 623–629.
713. Sumi T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N., et al. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc // *Oncogene*. — 2007. — Vol. 26. — P. 5564–5576.
714. Surani M. A. *Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance* // *Nature*. — 2001. — Vol. 414. — P. 122–128.
715. Suzuki A., Zheng Y., Kaneko S., et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver // *J Cell Biol*. — 2002. — Vol. 156. — P. 173–184.
716. Szilvassy S. J., Fraser C. C., Eaves C. J., et al. Retrovirus-mediated gene transfer to purified hemopoietic stem cells with long-term lympho-myelopoietic repopulating ability // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1989. — Vol. 86. — P. 8798–8802.
717. Tabar V., Studer L. Novel sources of stem cells for brain repair // *Clin. Neuroscience research*. — 2002. — Vol. 2. — P. 2–10.
718. Tabuchi C., Simmons D. J., Fausto A., et al. Bone deficit in ovariectomized rats // *J. Clin. Invest.*—1986. — Vol. 78. — P. 637–642.
719. Tada M., Tada T., Lefebvre L., et al. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells // *EMBO J*. — 1997. — Vol. 16. — P. 1553–1558.
720. Tada M., Takahama Y., Abe K., et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells // *Curr Biol*. — 2001. — Vol. 11, 19. — P. 1553–1558.
721. Takahashi K., Mitsui K., Yamanaka S. Role of Eras in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells // *Nature*. — 2003. — Vol. 423. — P. 541–545.
722. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors // *Cell*. — 2007. — Vol. 131. — P. 861–872.
723. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. — 2006. — Vol. 126. — P. 663–676.
724. Takahashi T., Kalka C., Masuda H., et al. Ischemia— and cytokine— induced mobilization of bone marrow—derived endothelial progenitor cells for neovascularization // *Nat. Med*. — 1999. — Vol. 5. — P. 434–438.
725. Tang D. G., Cao L. Z., Burkhardt B. R., et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow // *Diabetes*. — 2004. — Vol. 53, 7. — P. 1721–1732.
726. Taranger C. K., Noer A., Sorensen A. L., et al. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells // *Mol. Biol. Cell*. — 2005. — Vol. 16. — P. 5719–5735.
727. Tavian M., Cortes F., Charbord P., et al. Emergence of the haematopoietic system in the human embryo and foetus // *Haematologica*. — 1999. — Vol. 84. — P. 1–3.
728. Taylor S. M., Jones P. A. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine // *Cell*. — 1979. — Vol. 17. — P. 771–779.
729. Temple S. The development of neural stem cells // *Nature*. — 2001. — Vol. 414. — P. 112–117.
730. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion // *Nature*. — 2002. — Vol. 416, 6880. — P. 485–487.
731. Terskikh A. V., Easterday M. C., Li L., et al. From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. — 2001. — Vol. 98. — P. 7934–7939.
732. Tesar P. J., Chenoweth J. G., Brook F. A., et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // *Nature*. — 2007. — Vol. 448. — P. 196–199.
733. Theise N. D. New principles of cell plasticity // *C. R. Biol*. — 2002. — Vol. 325. — P. 1039–1043.

734. Theise N.D., Badve S., Saxena R., et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells of mice after radiation-induced myeloablation // *Hepatology*. — 2000. — Vol. 31. — P. 235–240.
735. Theise N.D., d'Inverno M. Understanding cell lineages as complex adaptive systems // *Blood Cells Mol Dis*. — 2004. — Vol. 32. — P. 17–20.
736. Theise N.D., Harris R. Postmodern biology: (adult)(stem) cells are plastic, stochastic, complex, and uncertain // *HEP*. — 2006. — Vol. 174. — P. 389–408.
737. Theise N.D., Krause D.S. Suggestions for a new paradigm of cell differentiative potential // *Blood Cells Mol Dis*. — 2001. — Vol. 27. — P. 625–631.
738. Theise N.D., Krause D.S. Toward a new paradigm of cell plasticity // *Leukemia*. — 2002. — Vol. 16. — P. 542–548.
739. Theise N.D., Krause D.S., Sharkis S. Comment on «Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells» // *Science*. — 2003. — Vol. 299. — P. 1317.
740. Theise N.D., Nimmakalu M., Gardner R., et al. Liver from bone marrow in humans // *Hepatology*. — 2000. — Vol. 32. — P. 11–16.
741. Theise N.D. Liver stem cells: prospects for treatment of inherited and acquired liver diseases // *Expert. Opin. Biol. Ther.* — 2003. — Vol. 3. — P. 403–408.
742. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. — 1998. — Vol. 282, 5391. — P. 1145–1147.
743. Thomson J.A., Odorico J.S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines // *Trends Biotechnol.* — 2000. — Vol. 18. — P. 53–57.
744. Thorgeirsson S. Hepatic stem cell in liver regeneration // *FASEB J.* — 1998. — Vol. 10. — P. 1249–1256.
745. Tisdale J.F., Dunbar C.E. Plasticity and hematopoiesis: Circes transforming potion? // *Curr. Opin. Hematol.* — 2002. — Vol. 9. — P. 268–273.
746. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J., et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin // *Nat. Cell. Biol.* — 2001. — Vol. 3. — P. 778–784.
747. Topley G.I., Okuyama R., Gonzales J.G., et al. p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96. — P. 9089–9094.
748. Torrente Y., Belicchi M., Sampaolesi M., et al. Human circulating AC133 stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 182–195.
749. Tosh D., Slack J.M. How cells change their phenotype // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 3. — P. 187–194.
750. Tran S.D., Pillemer S.R., Dutra A., et al. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study // *Lancet*. — 2003. — Vol. 361. — P. 1084–1088.
751. Tropepe V., Sibilio M., et al. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephala // *Dev. Biol.* — 1999. — Vol. 208. — P. 166–188.
752. Tropepe V., Coles B.L., Chiasson B.J., et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye // *Science*. — 2000. — Vol. 287. — P. 2032–2036.
753. Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C., et al. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism // *Neuron*. — 2001. — Vol. 30. — P. 65–78.
754. Tsai R.V.L., Kittappa R., McKay R.D.G. Plasticity, niches and the use of stem cells // *Develop. Cell*. — 2002. — Vol. 2. — P. 707–712.
755. Tsukada T., Tomooka Y., Takai S., et al. Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice // *Oncogene*. — 1993. — Vol. 8. — P. 3313–3322.
756. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering // *Arthritis Res. Ther.* — 2003. — Vol. 5. — P. 32–45.

757. Tuli R., Seghatoleslami M.R., Tuli S., et al. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone // *Mol. Biotechnol.* — 2003. — Vol. 23. — P. 37–49.
758. Uchida N., Buck D.W., He D., et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells // *Proc.Natl.Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 14720–14725.
759. Ura H., Usuda M., Kinoshita K., et al. STAT3 and Oct-3/4 control histone modification through induction of Eed in embryonic stem cells // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Vol. 283. — P. 9713–9723.
760. Vacanti M.P., Roy A., Cortiella J., et al. Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals // *J. Cell Biochem.* — 2001. — Vol. 80. — P. 455–460.
761. Vallieres L., Sawchenko P.E. Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity // *J. Neurosci.* — 2003. — Vol. 23. — P. 5197–5207.
762. Vassilopoulos G., Wang P.R., Russell D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion // *Nature.* — 2003. — Vol. 422. — P. 901–904.
763. Veeman M.T., Axelrod J.D., Moon R.T. A second canon. Functions and mechanisms of Beta-catenin-independent Wnt signaling // *Dev.Cell.* — 2003. — Vol. 5. — P. 367–377.
764. Verfaillie C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency // *Trends Cell Biol.* — 2002. — Vol. 12. — P. 502–508.
765. Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M. Adult stem cell plasticity: Dream or reality? // *Hematology.* — 2002. — Vol. 1. — P. 369–391.
766. Verfaillie C.M., Schwartz R., Reyes M., et al. Unexpected potential of adult stem cells // *Ann. NY. Acad. Sci.* — 2003. — Vol. 996. — P. 231–234.
767. Vessey C.J., de la Hall P.M. Hepatic stem cells: a review // *Pathology.* — 2001. — Vol. 33. — P. 130–141.
768. Vignery A. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism // *Int.J. Exp. Pathol.* — 1999. — Vol. 9. — P. 569–598.
769. Vogel G. Developmental biology. The hottest stem cells are also the toughest // *Science.* — 2001. — Vol. 292. — P. 429–432.
770. Voss A.K., Thomas T., Petrou P., et al. Taube nuss is a novel gene essential for the survival of pluripotent cells of early mouse embryos // *Development.* — 2000. — Vol. 127, 24. — P. 5449–5461.
771. Wagers A.J., Sherwood R.I., Christensen J.L., et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells // *Science.* — 2002. — Vol. 297. — P. 2256–2259.
772. Wagers A.J., Weissman I.L. Plasticity of adult stem cells // *Cell.* — 2004. — Vol. 116. — P. 639–648.
773. Wakayama T., Tabar V., Rodriguez I., et al. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer // *Science.* — 2001. — Vol. 292. — P. 740–743.
774. Wakitani S., Goto T., Pineda S.J., et al. Mesenchymal cell-based repair of large full-thickness defects of articular cartilage // *J. Bone Jt Surg.* — 1994. — Vol. 76. — P. 579–592.
775. Wakitani S., Saito T., Caplan A.J. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine // *Muscle Nerve.* — 1995. — Vol. 18. — P. 1417–1426.
776. Waldmann H. Therapeutic approaches for transplantation // *Curr. Opin. Immunol.* — 2001. — Vol. 13. — P. 606–610.
777. Waller E.K., Olweus J., Lund-Johansen F., et al. The «common stem cell» hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors // *Blood.* — 1995. — Vol. 85. — P. 2422–2435.
778. Wang J., Rao S., Chu J., et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells // *Nature.* — 2006. — Vol. 444. — P. 364–368.
779. Wang L., Li Y., Chen J., et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture // *Exp. Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 831–836.
780. Wang Q-R., Yan Z-J., Wolf N.S. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the growth of murine bone marrow CFU-F // *Exp. Hematol.* — 1990. — Vol. 18. — P. 341–347.

781. Wang X., Al-Dhalimy M., Lagasse E., et al. Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells // *Am. J. Pathol.* — 2001. — Vol. 158. — P. 571–579.
782. Wang X., Montini E., Al-Dhalimy M., et al. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation // *Am. J. Pathol.* — 2002. — Vol. 161. — P. 565–574.
783. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes // *Nature*. — 2003. — Vol. 422. — P. 897–901.
784. Watt F.M., Hogan B.L. Out of Eden: stem cells and their niches // *Science*. — 2000. — Vol. 287. — P. 1427–1430.
785. Weekx S.F.A., vanBockstaele D.R., Plum J., et al. CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood and adult bone marrow respond differently to hemopoietic cytokines depending on the ontogenic source // *Exp. Hematol.* — 1998. — Vol. 26. — P. 1034–1042.
786. Weimann J.M., Charlton C.A., Brazelton T.R., et al. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 2088–2093.
787. Weimann J.M., Johansson C.B., Trejo A., et al. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes // *Nat. Cell Biol.* — 2003. — Vol. 5. — P. 959–966.
788. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks and thresholds // *Cell*. — 1993. — Vol. 75. — P. 1241–1244.
789. Weintraub H., Groudine M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation // *Science*. — 1976. — Vol. 193. — P. 848–856.
790. Weissman I.L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities // *Science*. — 2000. — Vol. 287. — P. 1442–1446.
791. Weissman I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution // *Cell*. — 2000. — Vol. 100. — P. 157–168.
792. Wernig M., Lengner C.J., Hanna J., et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types // *Nat. Biotechnol.* — 2008. — Vol. 26. — P. 916–924.
793. Wernig M., Meissner A., Foreman R., et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES cell-like state // *Nature*. — 2007. — Vol. 448. — P. 318–324.
794. Wexler S.A., Donaldson C., Denning-Kendall P., et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 121. — P. 368–374.
795. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons // *Cell*. — 2002. — Vol. 110. — P. 385–397.
796. Wickham M.Q., Erickson G.R., Gimble J.M., et al. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee // *Clin. Orth. Rel. Res.* — 2003. Vol. 412. — P. 196–212.
797. Wiener F., Fenyo E.M., Klein G., et al. Fusion of tumour cells with host cells // *Nat. New Biol.* — 1972. — Vol. 238. — P. 155–159.
798. Wiener F., Fenyo E.M., Klein G. Tumor-host cell hybrids in radiochimeras // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1974. — Vol. 71. — P. 148–152.
799. Williams R.L., Klinken S.P. Plasticity in the haemopoietic system // *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* — 1999. — Vol. 31. — P. 1237–1242.
800. Wilmut I., Beaujean N., deSousa P.A., et al. Somatic cell nuclear transfer // *Nature*. — 2002. — Vol. 419. — P. 583–586.
801. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature*. — 1997. — Vol. 385. — P. 810–813.
802. Wobus A.M., Wallukat G., Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers // *Differentiation*. — 1991, — Vol. 48, 3. — P. 173–82.

803. Wolf N.S., Kone A., Priestley G.V., et al. In vivo and in vitro characterization of long-term re-populating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-Rhodamine 123 FACS selection // *Exp. Hematol.* — 1993. — Vol. 21. — P. 614–622.
804. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons // *J. Neurosci. Res.* — 2000. — Vol. 61. — P. 364–370.
805. Wulf G.G., Jackson K.A., Goodell M.A. Somatic stem cell plasticity: Current evidence and emerging concepts // *Exp. Hematol.* — 2001. — Vol. 29. — P. 1361–1370.
806. Wulf G.G., Luo K.L., Jackson K.J.A., et al. Cell of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells // *Haematologica.* — 2003. — Vol. 88. — P. 368–378.
807. Wurmser A.E., Gage F.H. Stem cells: cell fusion causes confusion // *Nature.* — 2002. — Vol. 416. — P. 485–487.
808. Wurmser A.E., Nakashima K., Summers R.G., et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage // *Nature.* — 2004. — Vol. 430. — P. 350–356.
809. Xie H., Ye M., Feng R. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages // *Cell.* — 2004. — Vol. 117. — P. 663–676.
810. Xu C., Police S., Rao N., Carpenter M.K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells // *Circ Res.* — 2002. — Vol. 91, 6. — P. 501–508.
811. Xu R.H., Chen X., Li D.S., et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast // *Nat. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 20. — P. 1261–1264.
812. Xu R.H., Sampsel-Barron T.L., Gu F., et al. Nanog is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs // *Cell Stem Cell.* — 2008. — Vol. 3. — P. 196–206.
813. Yamada T., Yoshikawa M., Kanda S., et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green // *Stem Cells.* — 2002. — Vol. 20. — P. 146–154.
814. Yamada T., Yoshikawa M., Takaki M., et al. In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells // *Stem Cells.* — 2002. — Vol. 20, 1. — P. 41–49.
815. Yamamoto H., Quinn G., Asari A., et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application // *Hepatology.*—2003. — Vol. 37. — P. 983–993.
816. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell.* — 2007. — Vol. 1. — P. 39–49.
817. Yamashita J., Itoh H., Hirashima M., et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors // *Nature.* — 2000. — Vol. 408, 6808. — P. 92–96.
818. Yamazaki M., Nakajima F., Ogasawara A., et al. Spatial and temporal distribution of CD44 and osteopontin in fracture callus // *J. Bone Joint Surg. Br.* — 1999. — Vol. 81. — P. 508–515.
819. Yang L., Li S., Hatch H., et al. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99. — P. 8078–8083.
820. Yang Z., Ding K., Pan L., et al. Math 5 determines the competence state of retinal ganglion cell progenitors // *Dev. Biol.* — 2003. — Vol. 264, 1. — P. 240 — 254.
821. Yasuda S.Y., Tsuneyoshi N., Sumi T., et al. Nanog maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer // *Genes Cells.* — 2006. — Vol. 11. — P. 1115 — 1123.
822. Yeo S., Jeong S., Kim J., et al. Characterization of DNA methylation change in stem cell marker genes during differentiation of human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2007. — Vol. 359. — P. 536–542.
823. Ying Cao, Zhao Sun, Lianming Liao, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — Vol. 332. — P. 370–379.
824. Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P., et al. Changing potency by spontaneous fusion // *Nature.* — 2002. — Vol. 416. — P. 545–548.

825. Ying Q. L., Nichols J., Chambers I., et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 // *Cell*. — 2003. — Vol. 115. — P. 281–292.
826. Yoder M. C. Introduction: spatial origin of murine hematopoietic stem cells// *Blood*. — 2001. — Vol. 98, 1. — P. 3–5.
827. Yoo J. U., Barthel T. S., Nishimura K., et al. The chondrogenic potential of human bone marrow derived mesenchymal progenitor cells // *J. Bone Joint Surg. Am.* — 1998. — Vol. 80. — P. 1745–1757.
828. Young H. E., Wright R. P., Mancini M. L., et al. Bioactive factors affect proliferation and phenotypic expression in pluripotent and progenitor mesenchymal stem cells // *Wound Repair Regen.* — 1998. — Vol. 6. — P. 65–75.
829. Young H. E., Steele T. A., Bray R. A., et al. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC Class-I // *Proc. Soc Exp Biol Med.* — 1999. — Vol. 221. — P. 63–71.
830. Young H. E., Steele T. A., Bray R. A., et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors // *Anat Rec.* — 2001. — Vol. 264. — P. 51–62.
831. Young R. G., Butler D. L., Weber W., et al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair // *J. Orthop. Res.* — 1998. — Vol. 16. — P. 406–413.
832. Yu J., Thomson J. A. Embryonic stem cells // *Regenerat. Med.* — 2006. — P. 1–12.
833. Yu J., Thomson J. A. Pluripotent stem cell lines // *Thermoscientific Genes & Dev.* — 2008. — Vol. 22. — P. 1987–1997.
834. Yu J., Vodyanik M. A., He P., et al. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion // *Stem Cells*. — 2006. — Vol. 24. — P. 168–176.
835. Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science*. — 2007. — Vol. 318. — P. 1917–1920.
836. Yui J., Chiu Choy-Pik, Lansdorp P. M. Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow // *Blood*. — 1998. — Vol. 99. — P. 3255–3262.
837. Zaehres H., Lensch M. W., Daheron I. D., et al. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells // *Stem cells*. — 2005. — Vol. 23. — P. 3255–3262.
838. Zaret K. S. Liver specification and early morphogenesis // *Mech. Dev.* — 2000. — Vol. 92. — P. 83–88.
839. Zhang S. C., Wernig M., Duncan I. D., et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* — 2001. — Vol. 19, 12. — P. 1129–1133.
840. Zhao L. R., Duan W. M., Reyes M., et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats // *Exp. Neurol.* — 2002. — Vol. 174. — P. 11–20.
841. Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair // *Blood Cells Mol Dis.* — 2004. — Vol. 33. — P. 211–215.
842. Zipori D., Bol S., The role of fibroblastoid cells and macrophages from mouse bone marrow in the in vitro growth promotion of haemopoietic tumour cells // *Exp. Hematol.* — 1979. — Vol. 7. — P. 206–218.
843. Zipori D., Lee F. Introduction of interleukin-3 gene into stromal cells from the bone marrow alters hemopoietic differentiation but does not modify stem cell renewal // *Blood*. — 1988. — Vol. 71. — P. 586–596.
844. Zipori D., Toledo J., von der Mark K. Phenotypic heterogeneity among stromal cell lines from mouse bone marrow disclosed in their extracellular matrix composition and interactions with normal and leukemic cells // *Blood*. — 1985. — Vol. 66. — P. 447–455.
845. Zou Y., Kottmann A. H., Kuroda M., et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development // *Nature*. — 1998. — Vol. 393. — P. 595–599.

846. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — Vol. 13. — P. 4279–4295.
847. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* — 2001. — Vol. 7. — P. 211–228.
848. Zulewski H., Abraham E.J., Gerlach M.J., et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes // *Diabetes.* — 2001. — Vol. 50. — P. 521–533.
849. Zvaifler N.J., Marinova-Mutafchieva L., Adams Moss J. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals // *Arthritis Research.* — 2000. — Vol. 2. — P. 477–488.

Для заметок



Для заметок



У книзі подано аналіз сучасних даних про молекулярні механізми і регуляцію поділу й диференціювання стовбурових клітин. Наведено дані про роль стовбурових клітин у розвитку різних органів і тканин, а також про їхній внесок у реалізацію відновлювальної регенерації при патологічних процесах. Особлива увага приділяється унікальним властивостям стовбурових клітин різного походження та їх терапевтичному потенціалу.

Книга розрахована на студентів та широке коло фахівців медико-біологічного профілю.

Наукове видання

Петренко Олександр Юрійович
Хунов Юрій Айдамірович
Іванов Едуард Миколайович

СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ.
ВЛАСТИВОСТІ І ПЕРСПЕКТИВИ КЛІНІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ
(російською мовою)

Монографія

Комп'ютерне верстання *С.А. Кузнецов*
Коректори *А.О. Вандюк, Д.В. Гірюшта*

Підписано до друку 2.12.2011. Формат 70х100/16.
Ум. друк. арк. 29,9. Тираж 1000 пр. Замовлення № Л1605.

Видавець і виготовлювач ТОВ «Прес-експрес», вул. Ватутіна, 89а, м. Луганськ, 91034.
Тел.: (0642) 33-11-98, 50-08-54.
Свідчення суб'єкта видавничої справи ДК №1713 від 16.03.2004.